

Aus der Klinik für Neuropädiatrie
Direktor: Prof. Dr. med. U. Stephani
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

***GRIN2A* – Kandidatengen bei idiopathischen (genetischen) Epilepsien im Kindesalter**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Katrin Maria Finsterwalder

aus Farchant

Kiel 2014

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ulrich Stephani, Klinik für Neuropädiatrie
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. G. Kuhlenbäumer, Klinik für Neurologie
- Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2015

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 13.09.2015

gez.: PD Dr. Rainer Boor
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

“The unknown is most dreaded. A flash of lightning used to be an instrument of destruction hurled by an angry god... A convulsive seizure is but the visible evidence of an electrical storm within the brain...written in ink for every layman to read...A convulsion is no more supernatural than a poor telephone connection”

William Gordon Lennox
(1884-1960)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1 Vorwort – Geschichte der Epilepsiegenetik	7
1.2 Epidemiologie und Klassifikation der Epilepsien	8
1.2.1 Epidemiologie	8
1.2.2 Klassifikation epileptischer Anfälle	8
1.2.3 Klassifikation der Epilepsien	9
1.3 Epilepsien im Kindesalter	9
1.3.1 IGE, Idiopathisch generalisierte Epilepsien	9
1.3.2 IFE, Idiopathisch fokale Epilepsien der Rolandischen Region	10
1.4 Genetische Grundlagen bei idiopathischen Epilepsien	11
1.4.1 Komplexe Vererbung	11
1.4.2 Kanalopathie	11
1.4.3 Häufige und seltene Varianten	12
1.4.4 Endophänotypisierung	12
1.4.5 Genetik idiopathisch generalisierter Epilepsien	13
1.4.6 Genetik idiopathisch fokaler Epilepsien der Rolandischen Region	15
2. Ziele dieser Arbeit	16
3. Material und Methoden	18
3.1 Identifikation neuer Kandidatengene für Epilepsien	18
3.1.1 Computergestützte Priorisierung - Identifikation von Kandidatengenen für den Endophänotyp der Photosensibilität	18
3.1.1.1 <i>Prioritizer</i>	18
3.1.1.2 <i>Endeavour</i>	19
3.1.1.3 <i>G2d</i>	19
3.1.1.4 <i>Prospectr&Suspects</i>	20
3.1.1.5 Selektion von Schlüsselkandidatengenen	20
3.1.2 Überlappende Mikrodeletionen - Identifikation des	

Kandidatengens für den Endophänotyp der centrotemporalen Spikes	22
3.2 Phänotypisierung	22
3.2.1 Idiopathisch generalisierte Epilepsien und Photosensitivität	22
3.2.2 Idiopathisch fokale Epilepsien der Rolandischen Region	23
3.3 Gensequenzierung	24
3.4 <i>In Silico</i> -Analysen identifizierter Polymorphismen (SNPs)	25
3.4.1 <i>PolyPhen2</i>	25
3.4.2 <i>SIFT</i>	25
3.4.3 <i>SNAP</i>	26
3.4.4 <i>HSF V2.4</i>	26
3.4.5 <i>BDGP</i>	26
3.4.6 <i>NetGene2</i>	27
3.4.7 <i>Spliceing Viewer</i>	27
3.4.8 <i>FASTSNP</i>	27
3.4.9 <i>SNPInspector2</i>	27
3.4.10 <i>FANS</i>	28
3.5 Kontrollkohorten und Bestätigungsanalysen	28
3.5.1 PopGen	28
3.5.2 Taqman SNP Assays	28
4. Ergebnisse	29
4.1 Identifikation neuer Kandidatengene für Epilepsien	29
4.1.1 Computergestützte Priorisierung	29
4.1.2 Überlappende Mikrodeletionen	30
4.2 Studienkohorten	32
4.2.1 Kohorte I - Idiopathisch generalisierte Epilepsien	32
4.2.2 Kohorte II - Idiopathisch fokale Epilepsien der Rolandischen Region	32
4.3 Gensequenzierung	33
4.3.1 Idiopathisch generalisierte Epilepsien	35
4.3.2 Idiopathisch fokale Epilepsien der Rolandischen Region	33

4.4	In <i>Silico</i> -Analysen	34
4.4.1	Idiopathisch Generalisierte Epilepsien und Photosensitivität	34
4.4.2	Idiopathisch fokale Epilepsien der Rolandischen Region	35
4.5	Kontrollkohorten und klinische Aspekte	37
4.5.1	Idiopathisch Generalisierte Epilepsien und Photosensitivität	37
4.5.2	Idiopathisch fokale Epilepsien der Rolandischen Region	37
5.	Diskussion	39
5.1	Diskussion der Methoden	39
5.1.1	Computergestützte Datenanalyse	39
5.1.2	In <i>Silico</i> -Analysen	40
5.2	Diskussion der Ergebnisse	42
5.2.1	<i>GRIN2A</i> - probates Kandidatengen für idiopathische Epilepsien	42
5.2.2	Sequenzierung und <i>In Silico</i> -Analysen	45
5.2.2.1	Idiopathisch generalisierte Epilepsien	45
5.2.2.2	Idiopathisch fokale Epilepsien	45
5.3	Limitierungen der Arbeit	46
5.4	funktionelle Relevanz der Ergebnisse und Ausblick	47
6.	Zusammenfassung	50
7.	Literaturverzeichnis	51
8.	Abbildungen – und Tabellenverzeichnis	61
9.	Anhang	63
9.1	Epilepsien im Kindesalter	63
9.2	Datenbanken der computergestützten Priorisierung	64
9.3	Primer	67
9.4	Glossar	68
10.	Danksagung	72
11.	Lebenslauf	73
12.	Publikationsverzeichnis	74

1. Einleitung

1.1 Vorwort – Geschichte der Epilepsiegenetik

Die Medizin und Deutung von Krankheiten, insbesondere der Epilepsie, war in der vorhippokratischen Zeit durch Priestermedizin und Glaube an übernatürliche, mystische Ursachen bestimmt. Zur Zeit des Hippokrates von Kos (ca. 460-377 v. Chr.) wurden Krankheiten erstmals wissenschaftlich-rational betrachtet (Schneble 2003). So heißt es in der Schrift¹ „über die heilige Krankheit“ („peri hiëräs nousou“): *„mit der so genannten heiligen Krankheit verhält es sich folgendermaßen: um nichts halte ich sie für göttlicher als die anderen Krankheiten oder heiliger, sondern sie hat eine natürliche Ursache wie die übrigen Krankheiten aus denen sie entsteht. Die Menschen sind zu der Ansicht dass sie göttlich sei, infolge ihrer Ratlosigkeit und Verwunderung gelangt; denn in nichts gleiche sie den anderen Krankheiten (...) die Menschen wählten die Gottheit als Deckmantel für ihre Hilflosigkeit: denn sie hatten nichts, mit dessen Anwendung sie helfen konnten;(...) In Wirklichkeit aber ist das Gehirn Schuld an diesem Leiden (...) Ihren Anfang hat sie wie die anderen in der Vererbung“* (Grensemann 1968) - bereits vor über zwei Jahrtausenden wurde somit eine genetische Veranlagung der Epilepsien vermutet. Aus den Büchern des Aretaios von Kappadokien (Wende vom 1. zum 2. Jh. n. Chr.) (Creutz 1934) und der Verteidigungsrede des Apuleius von Madaura (Helm 1977) geht hervor, dass das Phänomen der Photosensitivität (PPR) als Risikofaktor für ein epileptisches Leiden bereits in der Antike bekannt war. Auf dem römischen Sklavenmarkt wurde zur Ausmusterung epilepsiekranker Sklaven die Töpferscheibenmethode eingesetzt – durch Blick auf eine sich drehende Töpferscheibe wurde bei entsprechender Prädisposition ein epileptischer Anfall ausgelöst (Schneble 2003).

¹ Vermutlich aus der Zeit um 430 bis 410 v. Chr.. Es existieren keine sicheren Anhaltspunkte, dass der historische Hippokrates auch der tatsächliche Verfasser des Werkes war.

Der Ausspruch von W.G. Lennox aus dem Jahr 1960 „ *diese nachdrückliche Betonung einer physiologischen Grundlage epileptischer Anfälle (bei Hippokrates) erscheint mir wie ein Turm einer Hängebrücke, deren Zwillingssturm mehr als zwei Jahrtausende jenseits aufragt: das 5.Jahrhundert v. Chr. und unser 20. Jh. sprechen eigentlich die gleiche Sprache: Epilepsie ist hervorgerufen durch organische Veränderung des Gehirns*“ (Janz 1966) – verdeutlicht die lange Durststrecke für das medizinische Verständnis und die Erforschung der Epilepsie in den folgenden durch Mönchsmedizin und Glaube an göttliche Bestrafung dominierten Jahrhunderten (Schneble 2003).

Seit den 1920er Jahren war die Forschungsgruppe um William Gordon Lennox auf der Suche nach der Pathophysiologie der Epilepsie. W.G. Lennox ist durch seine Zwillingsstudien einer der Pioniere der modernen Epilepsiegenetik.

1.2 Epidemiologie und Klassifikation der Epilepsien

1.2.1 Epidemiologie

Mit einer Lebenszeitinzidenz von etwa 3 % und einer Prävalenz von 0,5-1% in der Normalbevölkerung zählen Epilepsien zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen (Hauser et al. 1993). Speziell im Kindesalter und hohen Erwachsenenalter zeigt sich eine erhöhte Inzidenz im Vergleich zu den anderen Altersgruppen. Inzidenzraten für epileptische Anfälle liegen nach internationaler Studienlage zwischen 24 und 69 je 100 000 Einwohner (Adelöw et al. 2009).

1.2.2 Klassifikation epileptischer Anfälle

Ein epileptischer Anfall stellt eine Funktionsstörung des Gehirns im Sinne einer abnormen, paroxysmalen, exzessiven, hypersynchronen epileptischen Entladung innerhalb von Neuronenverbänden dar. In der Regel sind epileptische Entladungen von selbst limitierendem Verlauf (Fisher et al. 2005). Die klinische Präsentation von epileptischen Anfällen wird prinzipiell unterteilt in fokale bzw.

partiale Anfälle, welche ihren Ursprung in neuronalen Netzwerken nehmen, dabei aber auf eine Hemisphäre begrenzt sind und generalisierte Anfälle, die von einem Punkt im Gehirn ausgehen und sich in neuronalen Netzwerken unter Einbezug beider Hemisphären ausbreiten (Fisher et al. 2005).

1.2.3 Klassifikation der Epilepsien

Für die Diagnose "Epilepsie" bedarf es mindestens eines epileptischen Anfalls in Verbindung mit einer andauernden Veränderung der Hirnfunktion, die ein erneutes Auftreten von epileptischen Anfällen begünstigt oder eine positive Anamnese von mindestens zwei (unprovozierten) Anfallsereignissen (Fisher et al. 2005; Fisher et al. 2014).

Epilepsien werden gemäß der ILAE-Klassifikation von 1989 unterteilt in symptomatisch bei Anhalt auf zu Grunde liegende strukturell-metabolische Läsion, idiopathisch bei genetischer Disposition, sowie kryptogen bei unbekannter Ätiogenese (ILAE 1989). Während idiopathische Epilepsien in der ILAE Klassifikation von 1989 noch als Epilepsien ohne strukturelles Korrelat und damit möglicher erblicher Genese verstanden wurden, wird die genetische Grundlage idiopathischer Epilepsien in der Klassifikation von 2010 (Berg et al. 2010) betont.

1.3 Epilepsien im Kindesalter

Bei Epilepsien des Kindesalters zeigt sich eine charakteristische Altersabhängigkeit der unterschiedlichen Epilepsiesyndrome. Eine detaillierte Tabelle der häufigen Epilepsiesyndrome und der charakteristischen Altersabhängigkeit ist im Anhang dargestellt.

1.3.1 IGE, idiopathisch generalisierte Epilepsien

Idiopathische (genetische) Epilepsien machen 20-40% aller Epilepsien aus und betreffen etwa 0,2 % der Bevölkerung (Jallon et al. 2005). Idiopathisch

generalisierte Epilepsien sind durch altersabhängigen Krankheitsbeginn, typische Klinik in einer Kombination aus Absencen, myoklonischen Anfällen und generalisierten tonisch-klonischen Anfällen, charakteristischen elektroenzephalographischen Eigenschaften wie generalisierter Spike-Wave-Aktivität und einer genetischen Grundlage charakterisiert (ILAE 1989). Zu den idiopathisch generalisierten Epilepsien zählen mehrere gut charakterisierte Subsyndrome wie CAE (Absence Epilepsie des Kindesalters), JAE (juvenile Absence Epilepsie), JME (juvenile myoklonische Epilepsie) und EGTCS (Epilepsien mit generalisierten tonisch-klonischen Anfällen).

1.3.2 IFE, Idiopathisch fokale Epilepsien der Rolandischen Region

Idiopathisch fokale Epilepsien der Rolandischen Region machen einen Anteil von 15-25 % kindlicher Epilepsien aus und umfassen unterschiedliche Phänotypen (Shields et al. 2009). Das Spektrum reicht von BECTS (benigne Epilepsie mit zentrotemporalen Spikes; Rolando-Epilepsie) über ABPE (atypische, benigne Partialepilepsie; Pseudo- Lennox-Syndrom, PLS), das LKS (Landau-Kleffner-Syndrom) bis zum CSWS (bioelektrischer Status mit kontinuierlichen „*spike-and-wave*“-Entladungen im Schlaf). Während BECTS charakterisiert ist durch fokale Anfälle mit typischer Semiologie („Rolando-Anfall“) und sekundär generalisierten Anfällen, einer niedrigen Anfallsfrequenz und einer guten Prognose (Sistieren der Anfälle in der Regel ab dem Pubertätsalter), so beschreibt ABPE ein komplexeres Epilepsiesyndrom mit Auftreten diverser Anfallsarten wie atypischen Absencen, atonischen, myoklonischen und generalisierten tonisch-klonischen Anfällen sowie Abwesenheitszuständen in Begleitung von globaler Entwicklungsverzögerung und/oder mentaler Retardierung (Hahn et al. 2001). Epileptische Anfälle können fehlen oder nur subtil auftreten bei CSWS und LKS, wobei Entwicklungsverzögerung, geistige Behinderung und eine erworbene Aphasie (vor allem bei LKS) typisch sind.

1.4 Genetische Grundlagen bei idiopathischen Epilepsien

Zwillingsstudien belegen eine genetische Grundlage bei idiopathisch generalisierten Epilepsien aber auch bei idiopathisch fokalen Epilepsien (Berkovic et al. 1998). Im Folgenden sollen kurz die wesentlichen Prinzipien der Genetik von häufigen Epilepsien erklärt werden, die für das Verständnis der weiteren Arbeit relevant sind.

1.4.1 Komplexe Vererbung

Oligogenetische oder polygenetische Vererbung werden unter dem Begriff komplexe Vererbung zusammengefasst. Modulierende Faktoren wie Umweltfaktoren oder epigenetische Phänomene können zusätzlich Einfluss auf Phänotypen nehmen. Bisher identifizierte genetische Veränderungen stellen nur einen geringen Teil der erblichen Grundlage bei komplexen Epilepsien dar (Mulley et al. 2005).

1.4.2 Kanalopathie

Genetische Veränderungen konnten bisher vor allem bei seltenen Epilepsien mit monogenen Erbgängen nachgewiesen werden. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um Gene für spannungsabhängige oder ligandengesteuerte Ionenkanäle. Beispielfhaft sei eine Mutation im *GABRA1*-Gen, der Alpha-1-Untereinheit des *GABA*-Rezeptorsubtyps alpha bei einer autosomal-dominanten Form der juvenilen myoklonischen Epilepsie genannt (Cossette et al. 2002).

Basierend auf der Hypothese, monogenetische Epilepsien seien im Wesentlichen Ionenkanalerkrankungen, diente dies zunächst als Ausgangspunkt für die Entschlüsselung der Genetik von Epilepsien mit polygenetischer Vererbung. Genetische Veränderungen wurden bisher nur bei einzelnen Familien nachgewiesen. Replikationsversuche in größeren Kohorten schlugen meist fehl.

Das Konzept „*Channelopathy*“ wird daher für die häufigen idiopathischen (genetischen) Epilepsien zunehmend in Frage gestellt.

1.4.3 Häufige und seltene Varianten

Seltene Mutationen können ebenso wie häufige Varianten (*common variants*) genetischen Erkrankungen zu Grunde liegen. Während sich seltene, krank machende Mutationen durch starke Effekte auf den Phänotypen auszeichnen und damit im Extremfall das genetische Korrelat bei monogenen Erkrankungen darstellen, fallen diese Effekte bei *common variants* geringer aus. *Common variants* stellen häufig auftretende Veränderungen mit geringem Effekt auf den Phänotypen dar. Sie entsprechen daher Risikofaktoren für eine Erkrankung mit komplexer Vererbung – erst durch eine Kumulation mehrerer Varianten kommt es zur Ausbildung einer Erkrankung (so genannte *common disease common variant hypothesis*). Eine Häufung von seltenen Varianten mit jeweils nur moderaten Effekten der Risikoerhöhung (*common disease rare variant hypothesis*) wird als eine weitere mögliche Grundlage für komplexe Erkrankungen diskutiert (Kryukov et al. 2007). Seltene Varianten (*rare variants*) finden sich definitionsgemäß bei weniger als 1% der Bevölkerung. Hinsichtlich Pathogenität und Häufigkeit sind *rare variants* zwischen den beiden Extremen seltener Mutationen und *common variants* anzusiedeln (Helbig et al. 2008). Diese stellen seltene Varianten mit moderaten Effekten dar und können bei oligo- und polygenetischen Vererbungsmechanismen zu Grunde liegen.

1.4.4 Endophänotypisierung

Ein Endophänotyp ist definitionsgemäß ein für eine Erkrankung charakteristischer Marker (z.B. ein objektivierbarer biochemischer oder endokrinologischer Marker, eine kognitive oder neurophysiologische Eigenschaft oder ein neuroanatomisches Merkmal), der auf genetischen

Veränderungen beruht (Gottesman et al. 2003). Unter der Vorstellung, dass ein für eine Erkrankung typisches Merkmal eine weniger komplexe genetische Struktur als die zu untersuchende Erkrankung aufweist, soll das Verständnis beteiligter Signalwege und Pathomechanismen sowie der zu Grunde liegenden genetischen Veränderungen vorangetrieben werden. Ein für genetische Analysen verwertbarer Endophänotyp muss folgende Eigenschaften aufweisen (Cannon et al. 2006):

Prävalenz und moderate Erbllichkeit: Endophänotypen sollten in moderater Häufigkeit in der allgemeinen Population vorkommen und eine Häufung bei der untersuchten Erkrankung aufweisen.

Ursächlichkeit und Messbarkeit: Endophänotypen sollten direkt an der zu Grunde liegenden Pathologie beteiligt sein. Risikofaktoren und Symptome (= eher Folgeerscheinungen) sind zur Analyse der genetischen Grundlagen ungeeignet.

Summationseffekt und Übertragbarkeit: Endophänotypen sind genetisch weniger komplex als die Erkrankung, die sie beeinflussen. Summationseffekt bedeutet, dass eine Erkrankung durch mehrere Endophänotypen beeinflusst sein kann. Endophänotypen können auch bei genetisch verwandten Erkrankungen mit ähnlichen, zu Grunde liegenden Pathomechanismen nachweisbar sein.

Erfolgreich eingesetzt wurde das Prinzip des Endophänotypen bereits bei der Entschlüsselung der komplexen Vererbung weiterer neurologischer Erkrankungen wie der Schizophrenie (Cannon et al. 2006).

Genetische Risikofaktoren konnten für den Endophänotyp der Periodic-Limb-Movements beim Restless-Legs-Syndrom identifiziert werden (Stefansson et al. 2007).

1.4.5 Genetik idiopathisch generalisierter Epilepsien

Zwillingsstudien, die Häufigkeiten von Erkrankungen bei monozygoten und dizygoten Zwillingspaaren vergleichen, deuten auf einen entscheidenden

Einfluss der Genetik für die Ätiopathogenese idiopathisch generalisierter Epilepsien hin (Berkovic et al. 1998). Für idiopathisch generalisierte Epilepsien ergeben sich Konkordanzen bei monozygoten Zwillingen von 86%, während deutlich niedrigere Konkordanzen (um 60%) bei dizygoten Zwillingen vorliegen (Vadlamudi et al. 2004). Diese Ergebnisse legen einen maßgeblichen Einfluss genetischer Faktoren nahe.

Genomweite Linkageanalysen ergeben diverse Loci mit möglichen Kandidatengenen für idiopathische Epilepsien. Signalstärken der einzelnen Loci unterscheiden sich in Abhängigkeit zu den prädominanten Anfallstypen in den untersuchten Familien (Hempelmann et al. 2006). Unterschiedliche Kombinationen der einzelnen Loci und Veränderungen verschiedener Kandidatengene führen am wahrscheinlichsten zu den heterogenen Phänotypen, wie sie in den verschiedenen IGE Familien deutlich werden (Durner et al. 2001). Vermutlich aufgrund der variablen Phänotypen, genetischer Heterogenität, komplexer Vererbungsmechanismen und der unterschiedlichen Penetranz ist es bisher kaum gelungen, Linkage Regionen im Rahmen von Replikationsstudien zu bestätigen. Dies gelang für idiopathische Epilepsien bisher nur für die Linkage-Regionen 13q31.3 und 2q34 (Leu et al. 2012).

Photosensitivität (PPR) tritt bei etwa 3 % der Bevölkerung auf und zeichnet sich durch eine signifikant höhere Inzidenz bei Patienten mit einer idiopathischen (genetischen) Epilepsie aus (Appleton et al. 2000; Fisher et al. 2005; Covanis et al. 2005). Photosensitivität ist Hinweis auf eine gesteigerte Erregbarkeit im Kortex und stellt damit einen geeigneten Endophänotypen für idiopathisch generalisierte (genetische) Epilepsien dar (Siniatchkin et al. 2007).

In einer genomweiten Linkage-Analyse, die vorangegangene Studien zu Photosensitivität und Analysen weiterer Familien umfasst, konnten drei Genloci mit 450 potentiellen Kandidatengenen für Photosensitivität identifiziert werden

(de Kovel et al. 2010). Andere Linkage-Regionen aus vorangegangenen Studien zu Photosensitivität (6p21, 7q32, 13q13 und 13q31(Pinto et al. 2007; Tauer et al. 2005)) konnten im Rahmen der genomweiten Analyse nicht repliziert werden.

1.4.6 Genetik idiopathisch fokaler Epilepsien der Rolandischen Region

Zwillingsstudien legen eine genetische Komponente bei idiopathisch fokalen Epilepsien nahe (Berkovic et al. 1998). Im Vergleich zu idiopathisch generalisierten Epilepsien ist der Einfluss von genetischen Faktoren an der Ätiopathogenese deutlich geringer, Umweltfaktoren scheinen bei idiopathisch fokalen Epilepsien der Rolandischen Region eine größere Rolle einzunehmen (Vadlamudi et al. 2004).

Idiopathisch fokale Epilepsien der Rolandischen Region zeichnen sich durch das gemeinsame EEG-Merkmal der zentrotemporalen Spikes (CTS) aus. CTS ist damit ein geeigneter Endophänotyp für idiopathisch fokale Epilepsien der Rolandischen Region. Familienstudien legen eine autosomal dominante Vererbung von CTS nahe (Bali et al. 2007; Vadlamudi et al. 2006). In genomweiten Kopplungsanalysen wurden für das EEG-Merkmal CTS die Linkage-Regionen 11p13 und 15q14 identifiziert (Neubauer et al. 1998; Pal et al. 2010). Durch anschließende Feinkartierung des Linkage-Peaks konnte für *ELP4*, Elongator-Protein-Komplex 4 als erstes Gen eine Beteiligung an einer häufigen idiopathisch fokalen Epilepsieform nachgewiesen werden (Strug et al. 2009). In sporadischen Fällen von Patienten mit Epilepsien der Rolandischen Region sowie gutartigen neonatalen Anfällen konnten Mutationen in den Genen der M-Typ-Kalium-Kanaluntereinheiten *KCNQ2* und *KCNQ3* nachgewiesen werden (Neubauer et al. 2008). Eine Assoziation von CTS konnte einzig für *ELP4* erfolgreich repliziert werden, eine kausale Mutation konnte bisher nicht identifiziert werden (Strug et al. 2009).

2. Ziele dieser Arbeit

Monogenetische Epilepsien stellen nur einen kleinen Teil an der Gesamtheit genetischer Epilepsiesyndrome dar. In der Regel liegen komplexe Vererbungsmechanismen vor. Bei den bisher identifizierten Genen handelt es sich zu einem Großteil um Ionenkanäle und deren Untereinheiten. Große Herausforderungen im Gebiet der Epilepsiegenetik stellen die variablen Phänotypen, eine reduzierte Penetranz, die komplexen Vererbungsmechanismen und die genetische Heterogenität dar.

Ziel dieser Arbeit war die Identifikation und Analyse neuer Kandidatengene für häufige, idiopathische (genetische) Epilepsien. Es wurden unterschiedliche Methoden zur Generierung neuer Kandidatengene eingesetzt.

Für die Kohorte idiopathisch generalisierter Epilepsien, die den Endophänotyp Photosensitivität (PPR) gemein haben, konnten in einer publizierten genomweiten Linkage Analyse 3 Genloci mit 450 potentiellen Kandidatengenen identifiziert werden (de Kovel et al. 2010). Genomweite Linkage-Studien stellen eine der Hauptsäulen in der genetischen Forschung dar, insbesondere bei der Suche nach neuen Kandidatengenen für Erkrankungen mit polygenetischer Vererbung. Eine besondere Herausforderung stellt die objektive Identifikation von geeigneten Kandidatengenen innerhalb der meist einige Megabasen umfassenden Linkage-Regionen dar. Zur objektiven Identifikation von Schlüsselkandidatengenen innerhalb der Loci erfolgte im Rahmen dieser Arbeit eine computergestützte Datenanalyse durch Einsatz von frei verfügbaren, internetbasierten, bioinformativen Programmen. *GRIN2A* wurde schließlich auf Grund der physiologischen und biologischen Eigenschaften als primäres Kandidatengen für weitere Analysen ausgewählt.

Parallel zu diesen Arbeiten konnten durch unsere Forschungsgruppe mit Hilfe der Array CGH² bei drei Indexpatienten mit idiopathisch fokalen Epilepsien, die

² Siehe Glossar

sich durch den Endophänotypen der *centrotemporalen spikes* (CTS) als gemeinsamen EEG-Merkmal auszeichnen, überlappende Mikrodeletionen im Bereich des Gens *GRIN2A* identifiziert werden.

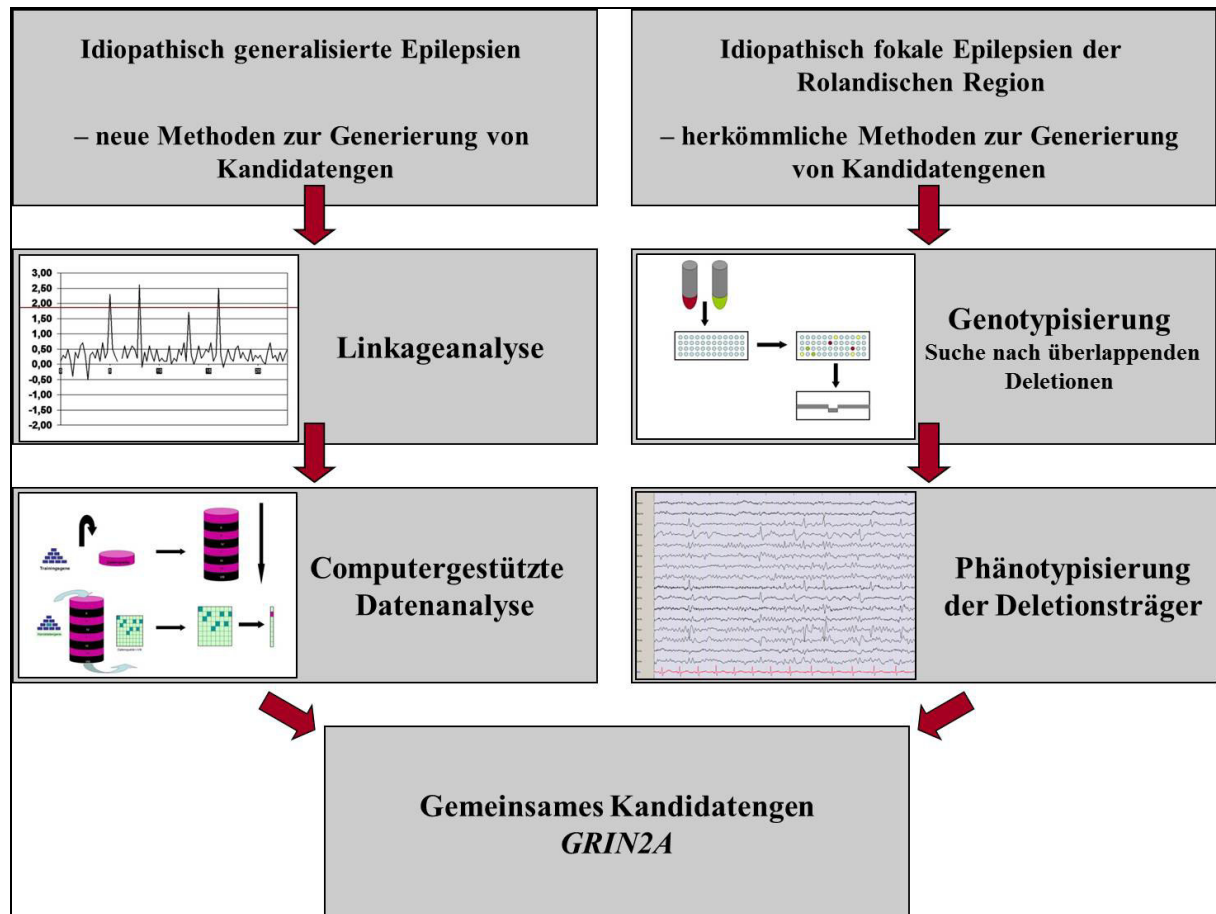


Abbildung 1: Identifikation von *GRIN2A* als Kandidatengen für idiopathische (genetische) Epilepsien:

Durch Kombination von neuen und herkömmlichen Methoden zur Generierung von Kandidatengen konnte *GRIN2A* als primäres Kandidatengen bei idiopathischen (genetischen) Epilepsien identifiziert werden. Abbildung 1a wurde umgezeichnet nach der Originalabbildung Figure 1c (Kovel et al., 2010). Abbildung 1b wurde umgezeichnet nach der Originalabbildung Figure 1 (Aerts et al., 2006). Abbildung 1c wurde umgezeichnet nach <http://www.reprogenetics-hh.de/img/array-cgh.jpg>.

Im zweiten Teil der Arbeit erfolgte die Analyse des Schlüsselkandidatengens *GRIN2A*. Es wurden Mutationsanalysen aller Exone, Intron-Exon-Übergänge und der Promotorregion in einer Kohorte von PPR-positiven Probanden und Patienten mit CTS durchgeführt.

3. Material und Methoden

Das Studiendesign wurde durch das örtliche Ethik-Komitee geprüft und genehmigt. Die Patienten wurden in der Klinik für Neuropädiatrie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel und im Norddeutschen Epilepsiezentrum für Kinder und Jugendliche (Schwentinental/Raisdorf) rekrutiert. Alle Patienten bzw. deren Erziehungsberechtigte oder gesetzliche Betreuer gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der wissenschaftlichen Studie.

3.1 Identifikation neuer Kandidatengene für Epilepsien

Im ersten Schritt erfolgte die Generierung von Kandidatengen für idiopathisch generalisierte und idiopathisch fokale Epilepsien mit jeweils unterschiedlichen Techniken.

3.1.1 Computergestützte Priorisierung - Identifikation von Kandidatengen für den Endophänotyp der Photosensibilität

Zur effektiven und effizienten Identifikation neuer Kandidatengene benutzten wir frei verfügbare, internetbasierte bioinformativ Programme zur Priorisierung. Der Einsatz bioinformativer Programme basiert auf der Vorstellung, dass die Mehrzahl der Gene, die an der Entstehung einer idiopathischen Epilepsie beteiligt sind, funktionell oder strukturell verwandt sind.

3.1.1.1 *Prioritizer*

Prioritizer ist ein bioinformatives Programm, das Informationen aus diversen Datenbanken mit Gen-Gen-Interaktionen innerhalb der untersuchten Loci integriert (Franke et al. 2006). Informationen aus verschiedenen unabhängigen

Datenbanken³ fließen in die Analyse der Gene ein. Unter der Hypothese, dass Gene innerhalb einer Krankheitsentität miteinander interagieren, bzw. funktionell verwandt sind, generiert *Prioritizer* Netzwerke gemäß der funktionellen Interaktion von Genen aus den unterschiedlichen Linkage-Regionen.

Prioritizer ist unter folgendem Link einsehbar:

www.prioritizer.nl

3.1.1.2 Endeavour

Endeavour ist ein internet-basiertes Computerprogramm, das "Test-Gene" gemäß ihrer Ähnlichkeit zu bereits identifizierten Krankheits-Genen, die als "Trainings-Gene" fungieren, sortiert. Dabei werden strukturelle Ähnlichkeiten wie Übereinstimmungen der Proteinstruktur und funktionelle Gemeinsamkeiten wie Protein-Protein-Interaktionen innerhalb der Zellen oder gemeinsame funktionelle Regulationsmechanismen und Beteiligung an gleichen Stoffwechselwegen berücksichtigt. Informationen aus diversen Quellen werden zu den einzelnen Testgenen integriert und fusioniert (Aerts et al. 2006; Tranchevent et al. 2008).

Endeavour ist unter folgender Internetadresse einsehbar:

www.esat.kuleuven.be/endeavour

3.1.1.3 G2d

G2d, „Genes to diseases“, basiert auf einem Algorithmus, der durch Integration von Daten aus biomedizinischen Datenbanken und Gensequenzanalysen ein Ranking der Gene innerhalb der untersuchten chromosomalen Regionen ermöglicht. Die Einteilung der jeweiligen Kandidatengene erfolgt dabei unter der besonderen Berücksichtigung der Genfunktion (Perez-Iratxeta et al. 2005; Perez-Iratxeta et al. 2007).

³ Die Internet-Adressen der einzelnen Datenbanken, die für die Analysen durch die bioinformativen Programme benutzt werden, sind im Anhang einsehbar.

G2d ist unter folgendem Link einsehbar:

www.g2d.ogic.ca

3.1.1.4 *Prospectr&Suspects*

PROSPECTR differenziert zwischen Genen, die auf Grund sequenzbasierter Merkmale, wie Länge des Gens, Länge des Proteins und Konservierung der Gensequenz (prozentualer Anteil homologer Genstrukturen bei verschiedenen Spezies), als potentielle Kandidatengene für Erkrankungen wahrscheinlich sind, und Genen, die auf Grund ihrer Strukturmerkmale eher ungeeignet erscheinen.

SUSPECTS priorisiert die durch *PROSPECTR* vorsortierten Gene, indem diese mit einem Satz „Trainingsgene“ bezüglich Parallelen bei den Strukturmerkmalen abgeglichen werden (Adie et al. 2005; Adie et al. 2006).

PROSPECTR and *SUSPECTS* sind unter folgenden Links einsehbar:

www.cgem.ed.ac.uk/resources/prospectr/

www.cgem.ed.ac.uk/resources/suspects/

3.1.1.5 Selektion von Schlüsselkandidatengenen

Die oben aufgelisteten Programme wurden für die Analyse der drei Linkage - Regionen Chr 5q35.3, Chr 8q21.12 und Chr 16p13.3 mit insgesamt 450 potentiellen Kandidatengenen kombiniert (de Kovel et al. 2010):

Chr 5q35.3 - 137 Gene

Chr 8q21.13 - 36 Gene

Chr16p13.3 - 277 Gene

Die Loci Chr 5q35.3, Chr 8q21.13 und Chr16p13.3 dienten als Input für *Endeavour*, *PROSPECTR* und *SUSPECTS* und *G2d*. Chromosomale Start – und Endpunkte +/- 5Mb der korrespondierenden Basenpaare dienten als Input für *Prioritizer* (5q35.3 = chr5:176.600.001-180.915.260; 8q21.13 = chr8:80.100.001-84.600.000; 16p13.3 = chr16: 1-7.900.000). *Endeavour* und *SUSPECTS* benötigen „Trainingsgene“. Die Ergebnisse einer Abfrage der

OMIM-Datenbank (*Online Mendelian Inheritance In Man*) für den Suchbegriff „Epilepsy“ (Stand der Abfrage: Juni, 2010) wurden als Trainingsgene eingespeist⁴. Alle Computerprogramme generieren Ranglisten – die Top 50 Gene der einzelnen Programme wurden in die weitere Analyse einbezogen.

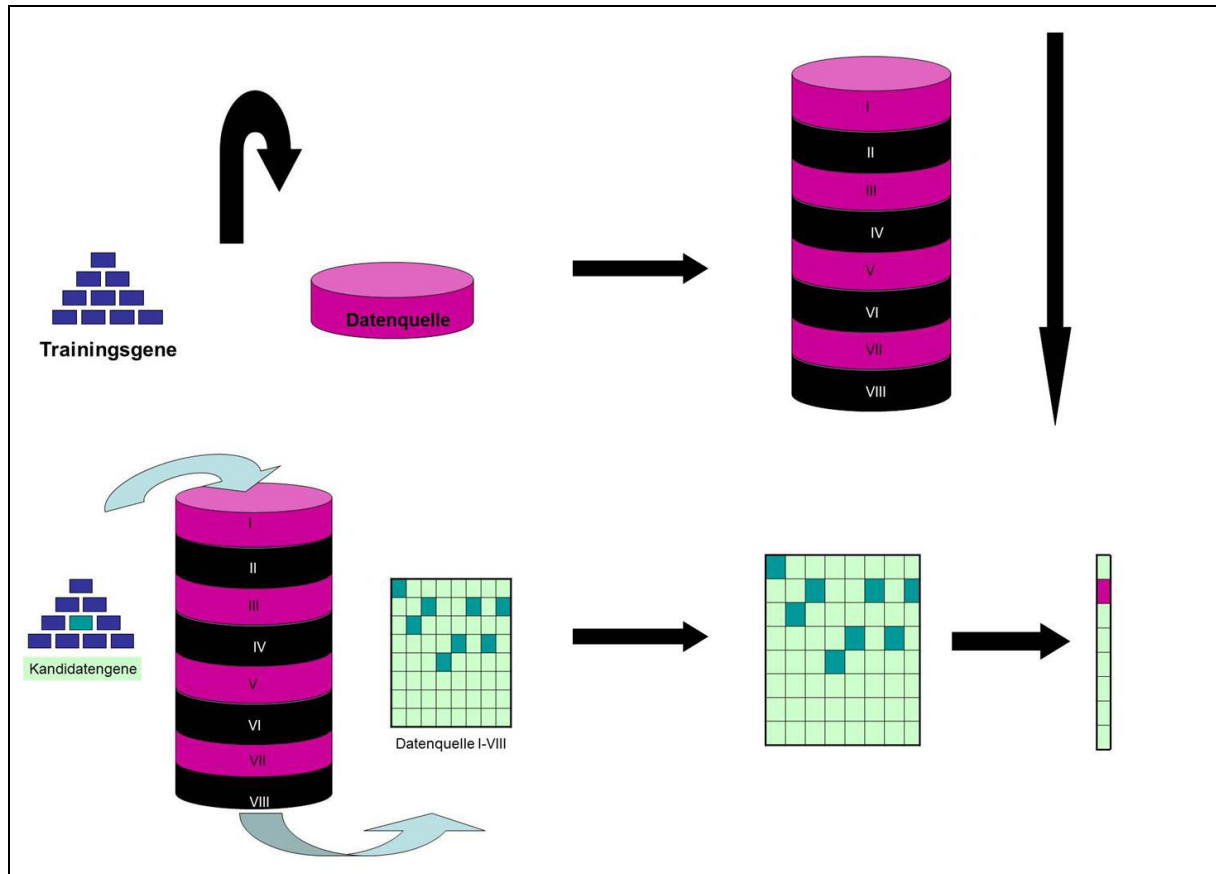


Abbildung 2: Schema zur Priorisierung

Schritt 1: die charakteristischen Daten und Informationen für bereits identifizierte Epilepsie-Gene, die als Trainingsgene fungieren, werden in den einzelnen Datenbanken gesammelt. **Schritt 2:** Wiederholung des ersten Schrittes in allen für die Analyse verfügbaren Datenbanken. **Schritt 3:** Abgleich über Gemeinsamkeiten zwischen den Kandidatengenen und den gesammelten charakteristischen Daten der Trainingsgene. **Schritt 4:** Es erfolgt die Fusion aller Daten aus den einzelnen Datenquellen. Die Kandidatengene werden nach der größtmöglichen Übereinstimmung gelistet. Die Abbildung veranschaulicht den Priorisierungsvorgang am Beispiel des internetbasierten Programms *Endeavour* und wurde umgezeichnet nach der Originalabbildung Figure 1 (Aerts et al., 2006).

Ein Gen wurde als geeignetes Kandidatengen für Photosensitivität angesehen, wenn eine Identifikation durch drei oder mehr Programme erfolgte.

⁴ Eine Tabelle der Trainingsgene (Stand der Abfrage: Juni, 2010) ist im Anhang einsehbar. Abbildung 2 veranschaulicht die Priorisierung der Kandidatengene am Beispiel des Algorithmus für *Endeavour*.

3.1.2 Überlappende Mikrodeletionen - Identifikation des Kandidatengens für den Endophänotyp der Centrotemporalen Spikes

In einer bereits publizierten Arbeit unserer Arbeitsgruppe wurde mittels *Array CGH* nach überlappenden strukturellen genetischen Veränderungen gesucht (Reutlinger et al. 2010)⁵.

3.2 Phänotypisierung

Die Phänotypisierung der eingeschlossenen Patienten erfolgte nach den Kriterien gemäß den ILAE Leitlinien 2001(Engel 2001).

3.2.1 Idiopathisch generalisierte Epilepsien und Photosensitivität

Einschlusskriterium war eine Photosensitivität Grad II-IV nach standardisierter Stimulation (Waltz et al. 1992):

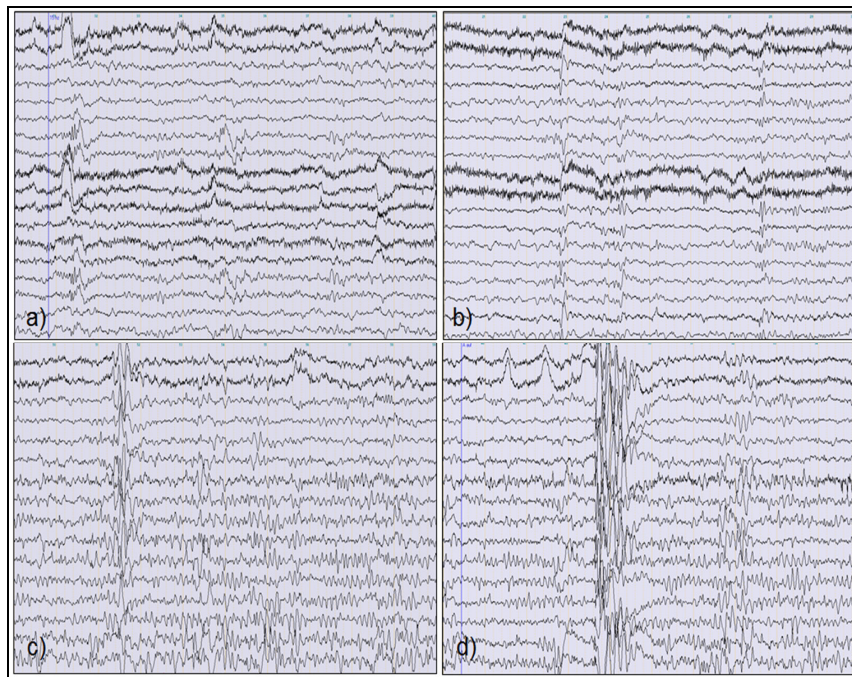


Abbildung 3: EEG-Beispiele zu Photosensitivität (PPR)

a) PPR Grad I –occipitaler alpha-Rhythmus mit Spikes b) PPR Grad II - parieto-occipitale Spikes mit biphasischen slow waves c) PPR Grad III - parieto-occipitale Spikes mit biphasischen slow waves und Ausbreitung in die Frontalregion d) PPR Grad IV: generalisierte Spikes and Waves und Polyspike Waves = photokonsulsive Reaktion. In die Studienkohorte wurden ausschließlich Patienten mit PPR Grad II-IV eingeschlossen Die EEG-Beispiele stammen aus der Klinik für Neuropädiatrie Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel.

⁵ Publikation aus der Arbeitsgruppe Pädiatrische Epilepsiegenetik der Klinik für Neuropädiatrie, Kiel

Es wurden Patienten mit der Diagnose einer idiopathisch generalisierten Epilepsie (CAE, JAE, JME oder EGTCS) plus Photosensitivität, sowie Patienten, die lediglich eine Photosensitivität im EEG ohne zusätzliche Diagnose einer Epilepsie aufwiesen (Routine-EEG im Rahmen der Abklärung anderer Krankheitsbilder wie z.B. Migräne, Restless Legs Syndrom oder ADHS), untersucht.

3.2.2 Idiopathisch fokale Epilepsien der Rolandischen Region

Einschlusskriterium war der Nachweis charakteristischer zentrotemporaler Spikes (CTS) im EEG sowie die Diagnose einer idiopathisch fokalen Epilepsie der Rolandischen Region (BECTS, ABPE).

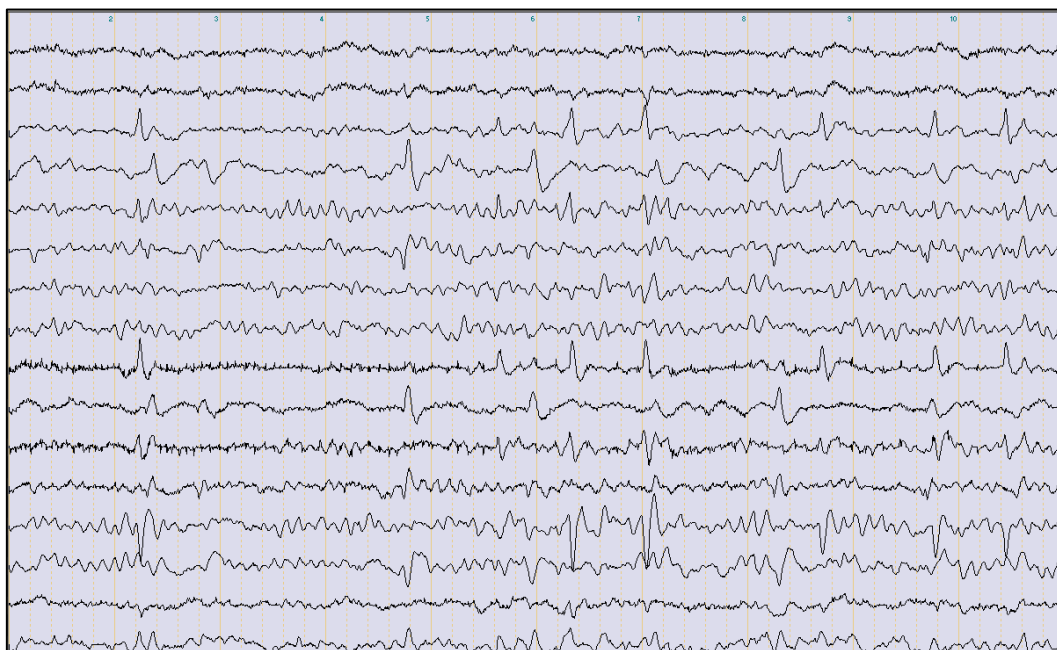


Abbildung 4: EEG-Beispiel zu centrottemporalen Spikes and Waves (CTS)

Typische, biphasische Rolando-Spikes und Sharp waves in den zentrotemporalen Ableitungen. Das EEG-Beispiel stammt aus der Klinik für Neuropädiatrie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel.

Im Rahmen dieser Studie wurden nur Patienten mit mildem Krankheitsverlauf untersucht. Patienten mit komplexen Epilepsiephänotypen, Sprachentwicklungsverzögerung und mentaler Retardierung wurden in der Studie nicht eingeschlossen.

3.3 Gensequenzierung

Die DNA-Extraktion erfolgte mittels des kommerziell erhältlichen Sets *FlexiGen DNA Kit*® der Firma QUIAGEN GmbH, Deutschland im Institut für Klinische Molekularbiologie der Christian-Albrechts-Universität Kiel (IKMB). Das Verfahren umfasst folgende Schritte:

1. Entfernen der Erythrozyten; Extraktion des Leukozytenfilms (*buffy coat*) aus der sedimentierten mit Gerinnungshemmern versetzten Blutprobe.
2. Lyse der Lymphozyten bei erhöhter Temperatur unter Zugabe von Puffer HL und Proteinkinase K.
3. Präzipitation der DNA durch Präzipitationslösung; Separierung der DNA durch Zentrifugation
4. Auflösung genomischer DNA unter Zugabe von 400-2000µl Puffer U.

Die eluierte DNA ist gebrauchsfertig für weiterführende Analysen.

Sequenzanalyse: Die Polymerasekettenreaktion (PCR)⁶ mit anschließender bidirektionaler Sequenzanalyse wurde gemäß Standardprotokollen (Verfahrensbeschreibung: (Franke et al. 2008)) am Institut für Klinische Molekularbiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (IKMB) durchgeführt. Es wurden alle Exone, die Exon-Intron-Übergangsbereiche sowie die Promotorregion mittels *NCBI Primer Set RSS000057426.1* und zusätzlichen Primern (*Primer3*, www.primer3.sourceforge.net) analysiert⁷.

Die Identifikation neuer und bereits bekannter *Single Nucleotid Polymorphisms* (SNPs) sowie Inversionen und Deletionen erfolgte anschließend mit Hilfe des frei verfügbaren Programms *NovoSNP 3.0* (Weckx et al. 2005).

⁶ Siehe Glossar

⁷ Die angewandten Primer sind im Anhang aufgeführt.

3.4 In Silico-Analysen identifizierter Polymorphismen (SNPs)

Um die funktionelle Bedeutung der neu identifizierten Polymorphismen weiter eingrenzen zu können wurden verschiedene frei verfügbare, internetbasierte bioinformativ Programme benutzt:

- für *non-synonymous SNPs* in den Exonregionen: *PolyPhen2*, *SIFT*, *SNAP*
- für *SNPs* in den Intronregionen: *HSF V2.4*, *BDGP*, *NetGene2*, *Splice view*
- für die Analyse der Promotorregion: *FastSNP*, *SNP Inspector 2.2*, *FANS*

3.4.1 PolyPhen2

PolyPhen2 (*Polymorphism Phenotyping Server*) untersucht Effekte von *non-synonymous SNPs* (nsSNP)⁸ auf Proteinstruktur und -funktion. Das ursprüngliche Allel und die Mutation werden basierend auf der HGVS-base Datenbank in Bezug auf differente sequenzbasierte und strukturbasierte Merkmale wie Änderung in der elektrischen Ladung, der Hydrophobizität, der Seitenkettenlänge, Berücksichtigung von 3D-Struktur im Protein und intermolekulare Kontakte untersucht (Ramensky et al. 2002; Adzhubei et al. 2010).

Internet: www.genetics.bwh.harvard.edu/pph2

3.4.2 SIFT

SIFT (*Sorting Tolerant From Intolerant Algorithm*) klassifiziert das Ausmaß des Einflusses einer nicht-synonymen Mutation (*nsSNP*) auf die Proteinfunktion auf der Basis von Sequenzhomologie. Bedeutende Strukturen in der Proteinsequenz weisen ein hohes Maß an Konservierung auf. Ein Basenaustausch an derartigen Positionen birgt nach bisherigem Wissensstand mit erhöhter Wahrscheinlichkeit eine Beeinflussung der Proteinfunktion in sich. Eine Einteilung der Mutationen erfolgt in DAMAGING oder TOLERATED mit Hilfe eines Scores zwischen 0

⁸ Siehe Glossar

und 1. Scores unter 0,05 bedeuten dabei eine Beeinträchtigung der Proteinfunktion durch die Mutation (Ng and Henikoff 2003; Kumar et al. 2009).

Internet: www.sift.jcvi.org

3.4.3 SNAP

SNAP (Screening For Non-acceptable Polymorphisms' Algorithm) integriert Informationen zu biochemischen Eigenschaften der ausgetauschten Aminosäuren, Evolutionsdaten und Sequenzinformationen der *Protein Mutant Database (PMD)* (Nishikawa et al. 1994; Kawabata et al. 1999). Als Input dienen die Sequenzdaten; Informationen zur Funktionalität und Proteinstruktur sind fakultativ. Ein Score, für die Wahrscheinlichkeit einer möglichen Beeinflussung der Proteinfunktion von 0 (niedrig) bis 9 (hoch) für die jeweilige Mutation wird ermittelt (Bromberg and Rost 2007; Bromberg et al. 2008).

Internet: www.rostlab.org/services/SNAP/

3.4.4 HSF V2.4

HSF V2.4 (Human Splicing Finder) ist ein Programm zur Identifikation von Splicing Sequenzen innerhalb der Gensequenz und zur Einschätzung des Effekts von Mutationen auf Splicing Signale (Desmet et al. 2009).

Internet: www.umd.be/HSF

3.4.5 BDGP

Bei *BDGP (Berkeley Drosophila Genome Project)* handelt es sich um ein Programm zur Vorhersage von *Splice Sites* basierend auf dem *Generalized Hidden Markov Model (GHMM)* zur Identifikation von Splicing Signalen innerhalb einer Gensequenz und des Effektes von Punktmutationen auf Splicing Signale (Reese et al. 1997).

Internet: www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html

3.4.6 NetGene 2

NetGene2 basiert auf einem zweiteiligen Algorithmus zur Identifikation von *Splice Sites* in der prä-mRNA. Der Effekt von Mutationen auf das Spleißverhalten wird abgeschätzt.

Internet: www.cbs.dtu.dk/service/NetGene2/

3.4.7 Splicing Viewer

Internetbasiertes Programm zur Detektion, Auflistung und Visualisierung von alternativen Splicingvarianten an Hand eines Gen-Modells.

Internet: www.bioinformatics.zj.cn/splicingviewer/

3.4.8 FASTSNP

FASTSNP (Function Analysis And Selection Tool For Single Nucleotide Polymorphisms) ist ein Internetprogramm zur Priorisierung von SNPs, vornehmlich der Promotorregion. Daten aus 11 unabhängigen Webservern fließen zur Abschätzung des Risikoprofils in Bezug auf Affektion der Proteinfunktion und Einfluss auf Phänotypen in die Analyse ein (Yuan et al. 2006).

Internet: www.fastsnp.ibms.sinica.edu.tw

3.4.9 SNPInspector 2.2

SNPInspector 2.2 dient der Analyse der Promotorregion in Hinblick auf Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (Transcription factor binding sites, *TFBS*)⁹ (Cartharius et al. 2005).

Internet: www.genomatix.de/

⁹ Das Programm ist nach Registration innerhalb der Geomatix Plattform für akademische Zwecke online verfügbar.

3.4.10 FANS

In Silico-Analyse von Transkriptionsfaktorbindungsstellen. Dieses Programm ist derzeit online nicht mehr verfügbar.

3.5 Kontrollkohorten und Bestätigungsanalysen

3.5.1 PopGen

Die Biomaterialdatenbank PopGen (<http://www.popgen.de/>) untersteht der wissenschaftlichen Leitung des Lehrstuhls für Epidemiologie am Institut für experimentelle Medizin (IEM) der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Das Projekt dient der genetischen Grundlagenforschung bei Volkskrankheiten mit komplexen Vererbungsmechanismen, wie beispielsweise Herz-Kreislaufkrankungen, Diabetes oder neurologische Erkrankungen.

Bei Probanden der Kontrollkohorte von PopGen handelt es sich um gesunde Blutspender und weitere gesunde Kontrollpersonen. Es erfolgte keine fachärztliche Untersuchung vor Einschluss in die Kontrollkohorte. Ein Screening auf neurologische Erkrankungen, unter anderem Epilepsien, erfolgte mittels Fragebögen.

Insgesamt wurden 358 Probanden ohne Hinweis auf neurologische Erkrankungen, insbesondere ohne Anamnese von Epilepsien in der Familie, für diese Arbeit als Kontrollkohorte zur Validierung der ermittelten Polymorphismen rekrutiert.

3.5.2 Taqman SNP Assays

Mittels TaqMan® SNP Genotyping Assays von Applied Biosystems (ABI) erfolgte am Institut für Klinische Molekularbiologie der Christian-Albrechts-Universität Kiel (IKMB) ein Screening auf die identifizierten Polymorphismen in einer Kontrollkohorte von 358 Probanden ohne Hinweis auf neurologische Erkrankungen, insbesondere ohne Anamnese von Epilepsien in der Familie.

4. Ergebnisse

4.1 Identifikation neuer Kandidatengene für Epilepsien

4.1.1 Computergestützte Priorisierung

Ein Gen wurde als geeignetes Kandidatengene für Photosensitivität angesehen, wenn in der computergestützten Priorisierung eine Identifikation durch mindestens drei der insgesamt vier angewandten Programme erfolgte. *Prospectr* und *Suspects* wurden dabei ob ihrer ähnlichen Bewertungskriterien als 1 Programm gewertet. Bei der Auswertung wurden die Top 50 Kandidatengene aus den Analysen der einzelnen Programme berücksichtigt. Die so identifizierten Kandidatengene sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

<i>Symbol</i>	<i>Name</i>	<i>Lokalisation</i>	<i>Endeavor</i>	<i>Prioritizer</i>	<i>G2d</i>	<i>Prospectr & Suspects</i>
<i>ABCA3</i>	ATP-binding cassette, sub family A (ABC1), member 3	Chr. 16p13.3: 2,325,877-2,390,747	x	-	x	x
<i>B4GALT7</i>	Xylosylprotein beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 7 (galactosyltransferase I)	Chr. 5q35.3: 177,027,101-177,037,348	x	x	x	x
<i>CLCN7</i>	chloride channel 7	Chr. 16p13.3: 1,494,935-1,525,085	x	x	x	x
<i>DDX41</i>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 41	Chr. 5q35.3: 176,938,578-176,944,470	-	x	x	x
<i>GRIN2A</i>	Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2A	Chr. 16p13.3: 9,847,261-10,276,611	x	-	x	x
<i>PKD1</i>	Polycystic kidney disease 1 (autosomal dominant); transient receptor potential cation channel, subfamily P member 1	Chr. 16p13.3: 2,138,711-2,185,899	x	-	x	x

Tabelle 1: Priorisierung der Kandidatengene durch computergestützte Datenanalyse

Liste der Kandidatengene, die durch mindestens drei der frei verfügbaren, internetbasierten Programme, die im Rahmend dieser Studie benutzt wurden, als potentiell Kandidatengene identifiziert wurden.

Auf Grund der biologischen Eigenschaften von *GRIN2A*, einem Gen das für die Alpha-2-Untereinheit eines neuronalen N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors (NMDA) codiert und den Hinweisen einer Beteiligung von *GRIN2A* an der Äthiopathogenese bei Epilepsien (Endele et al. 2010, Reutlinger et al. 2010)

wurde *GRIN2A* als primäres Kandidatengen für weitere Analysen in Form von Gensequenzierung ausgewählt.

4.1.2 Überlappende Mikrodeletionen

Ein genomweites Screening auf strukturelle genetische Varianten mittels Array CGH ergab überlappende Deletionen der chromosomalen Region 16p13 bei drei Patienten mit globaler Entwicklungsverzögerung, dysmorphen Zügen und Epilepsien der Rolandischen Region (Reutlinger et al. 2010)¹⁰:

Patient I der Publikation leidet an einer atypischen benignen Partial-Epilepsie (ABPE, Pseudo-Lennox-Syndrom) – mit atypischen Absencen, atonen Anfällen, Lidmyoklonien und perioralen Myoklonien, Umdämmungsstadien sowie generalisiert tonisch-klonischen Anfällen. Im EEG zeigen sich bilaterale zentrotemporale Spikes und Muster einem ESES entsprechend. Des Weiteren bestehen eine schwere, sprachbetonte, globale Entwicklungsverzögerung und weitere dezente Dysmorphiezeichen (Reutlinger et al. 2010).

Patient II zeigt charakteristische Anfälle einer benignen Epilepsie mit zentrotemporalen Spikes, im Alter von 11 Jahren wurde die Diagnose einer Rolando Epilepsie (BECTS) gestellt. Des Weiteren bestehen eine milde Retardierung mit vorwiegender Sprachentwicklungsverzögerung und ebenfalls dezente Dysmorphiezeichen (Reutlinger et al. 2010).

Auch bei Patient III wurden bereits im ersten Lebensjahr Dysmorphiezeichen und eine schwere Entwicklungsverzögerung festgestellt. Im EEG zeigten sich zentrotemporale Spikes und charakteristische ESES-typische Muster (Reutlinger et al. 2010).

¹⁰ Publikation aus der Arbeitsgruppe Pädiatrische Epilepsiegenetik der Klinik für Neuropädiatrie, Kiel

<i>Patient</i>	<i>Epilepsieform</i>	<i>Deletion</i>
Patient I	ABPE	2.6 Mb Deletion Chr16 : 7904000-105150000
Patient II	BECTS	980 Kb Deletion Chr16: 89000000-99000000
Patient III	CSWS	1,9 Mb Deletion Chr16: 92730000-11180700

Tabelle 2: Mikrodeletionen auf Chromosom 16p13

Die Mikrodeletionen bei drei Indexpatienten mit idiopathisch fokalen Epilepsien der Rolandischen Region, Entwicklungsverzögerung und geistiger Retardierung auf Chr.16p13 überlappen sich im Bereich des Genlocus von *GRIN2A* (Reutlinger et al. 2010).

Für *GRIN2A* ergaben sich überlappende Deletionen bei allen drei Patienten. Innerhalb der größeren Deletion bei Patient I liegt außerdem die Region des Gens *ABAT*, das für ein Schlüsselenzym des GABA-Metabolismus codiert.

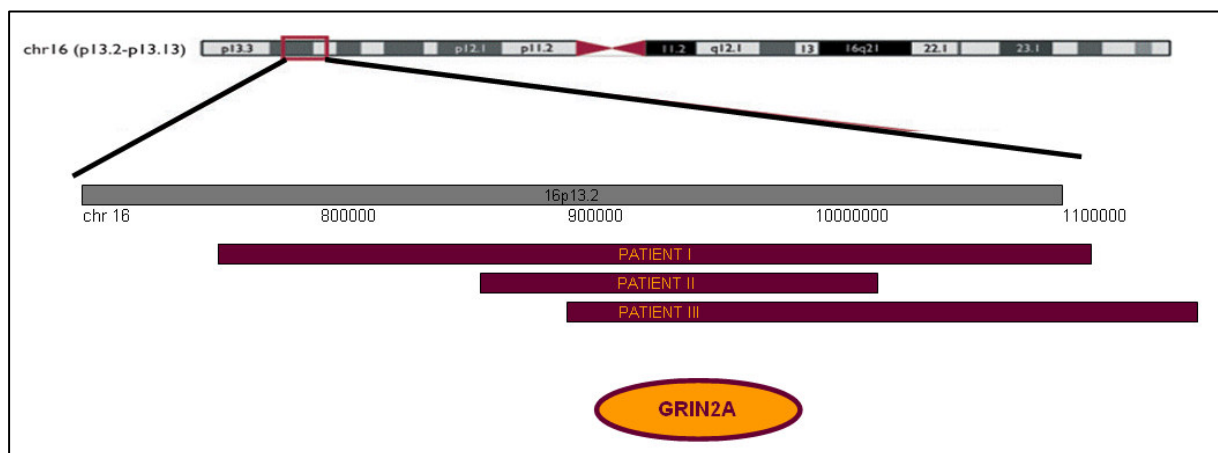


Abbildung 5: Deletionen bei Patienten mit idiopathisch fokalen Epilepsien der Rolandischen Region

Im Überlappungsbereich der Deletionen bei den drei Indexpatienten liegt nur der Genlocus von *GRIN2A* (Reutlinger et al. 2010). Abbildung nachgezeichnet nach Originalabbildung des UCSC Genome Browser, Release March 2006 (<http://genome.ucsc.edu/>).

Die identifizierten Deletionen wurden bisher nicht als genomische Varianten beschrieben, eine Bestätigung mittels *FISH* Analyse ist erfolgt.

Auf Grund der Überlappungsbereiche bei allen drei Patienten, den biologischen Eigenschaften von *GRIN2A* und Hinweisen auf eine Beteiligung von *GRIN2A* an der Ätiopathogenese von Epilepsien (Endele et al. 2010) wurde *GRIN2A* als Kandidatengen für idiopathisch fokale Epilepsien der Rolandischen Region zu weiteren Analysen ausgewählt.

4.2 Studienkohorten

4.2.1 Kohorte I - Idiopathisch generalisierte Epilepsien

Die Studienkohorte I (PPR) umfasste 48 Patienten mit Photosensitivität Grad II-IV. Bei 26 Patienten wurde die Diagnose einer idiopathisch generalisierten Epilepsie gestellt. 22 Patienten waren ohne Diagnose einer Epilepsie und wiesen lediglich das Merkmal einer Photosensitivität Grad II-IV im EEG auf.

<i>Patienten mit IGE und Photosensitivität:</i>		<i>Patienten mit Photosensitivität ohne Epilepsie:</i>	
Epilepsie	Anzahl	Diagnose	Anzahl
CAE	3	ADHS	3
EOAE	1	Migräne/ Kopfschmerz	15
GTCS	7	Synkope	1
JAE	2	Tic	1
JME	8	Verhaltensauffälligkeiten	2
IGE nicht weiter klassifiziert	2		
abnormes EEG	3		
Gesamt	26	Gesamt	22

Tabelle 3: Patientenkohorte I (PPR):

In dieser Patientenkohorte wurden sowohl Patienten mit isolierter Photosensitivität (Nachweis einer Photosensitivität im Rahmen der Diagnostik von neurologischen Erkrankungen bei negativer Anamnese für Krampfanfälle) als auch Patienten mit Photosensitivität und Diagnose einer idiopathisch generalisierten Epilepsie aufgenommen.

4.2.2 Kohorte II - Idiopathisch fokale Epilepsien der Rolandischen Region

Die Studienkohorte II (CTS) umfasste 39 Patienten. Bei 32 Patienten wurde eine benigne Epilepsie mit zentrot temporalen Spikes (BECTS) diagnostiziert, bei weiteren 6 Patienten eine atypische benigne Partialepilepsie (ABPE) und bei einem Patienten ein komplexerer Epilepsiephänotyp mit *continuous spikes and waves during sleep* (CSWS):

<i>Epilepsieform:</i>	<i>Anzahl Patienten</i>
Benigne Epilepsie mit zentrot temporalen Spikes, BECTS	32
Atypische benigne Partialepilepsie, ABPE	6
CSWS	1
Gesamt:	39

Tabelle 4: Patientenkohorte II (CTS):

In dieser Patientenkohorte wurden überwiegend Patienten mit der Diagnose einer benignen Epilepsie mit zentrot temporalen Spikes, BECTS oder der Diagnose einer atypischen benignen Partialepilepsie, ABPE, eingeschlossen. Lediglich ein Patient wies einen komplexeren Epilepsiephänotyp mit der Diagnose eines CSWS auf.

4.3 Gensequenzierung

4.3.1 Idiopathisch generalisierte Epilepsien und Photosensitivität

Die Analyse aller Exone, Exon-Intron-Überlappungsbereiche und der Promotorregion ergab sieben bislang nicht identifizierte Polymorphismen¹¹.

<i>Lokalisation</i>	<i>Position (NCBIBuild37)</i>	<i>Basenaustausch</i>	<i>AS-Austausch</i>	<i>Anzahl Probanden</i>
5'UTR, Promotorregion	g.10277263	G>A	-	9
5'UTR, Promotorregion	g.10277068	G>A	-	1
5'UTR, Promotorregion	g.10276998	T>C	-	1
5'UTR, Exon 2	g.10275749	C>A	-	1
Intron 9/10	g.9923799	A>C	-	1
Intron 13/14	g.9858894	T>C	-	1
Exon 14	g.9858211	A>G	p.Thr1064Ala	1

Tabelle 5: Polymorphismen der Kohorte I

Lokalisation der bislang nicht identifizierten Polymorphismen für die Patientenkohorte I, Patienten mit Photosensitivität +/- idiopathisch generalisierter Epilepsie.

Der Polymorphismus (g.10277263G>A) innerhalb der Promotorregion war heterozygot bei 8 von 48 Probanden (16,7%) und homozygot bei einem weiteren Probanden (2,1%) nachweisbar. Alle weiteren identifizierten Polymorphismen fanden sich bei je einem Patienten in heterozygoter Form.

4.3.2 Idiopathisch fokale Epilepsien der Rolandischen Region

In der Gruppe der Patienten mit idiopathisch fokalen Epilepsien der Rolandischen Region ergab die Analyse aller Exone, Exon-Intron-Überlappungsbereiche und der Promotorregion 26 Single Nukleotid Polymorphismen (SNPs) mit acht bislang nicht bekannten Varianten:

- 1 kodierende, nicht-synonyme Variante (*non-synonymous SNPs*),
- 4 kodierende, synonyme Polymorphismen (*synonymous SNPs*)
- 2 nicht kodierende Varianten (1 im Intronbereich, 1 innerhalb der 3'UTR-Region)

¹¹ Die Ergebnisse aus der Studienkohorte I (PPR) wurden 2011 durch unsere Arbeitsgruppe in dem wissenschaftlichen Journal *Epilepsia* veröffentlicht (von Spiczak et al. 2011).

<i>Lokalisation</i>	<i>Position (NCBIBuild37)</i>	<i>Basenaustausch</i>	<i>AS-Austausch</i>	<i>Anzahl Probanden</i>
Exon 4	g.10031884	C>T	-	1
Exon 4	g.10031881	C>T	-	1
Exon 4	g.10032095	C>T	p.Ala243Val	1
Intron 9/10	g.9927905	T>C	-	1
Exon 14.2	g.9858155	C>T	-	1
Exon 14.3	g.9858123	C>G	-	1
Exon 14.4	g.9857574	C>G	p.Ala1276Gly	1
3'UTR	g.9856967	G>A	-	1

Tabelle 6: Polymorphismen der Kohorte II

Lokalisation der neu identifizierten Polymorphismen für die Patientenkohorte II, Patienten mit idiopathisch fokaler Epilepsie der Rolandischen Region

Alle identifizierten Polymorphismen fanden sich bei jeweils einem Patienten.

4.4 *In Silico*-Analysen

Im Anschluss an die Sequenzierung erfolgte eine weitere Analyse der identifizierten Polymorphismen mittels bioinformativer Programme – *Polyphen*, *SIFT* und *SNAP* zur Analyse von *non-synonymous SNPs*, *BDGP* und *HSFV2.4*, *NetGene 2* und *Splice viewer* zur Analyse von Polymorphismen im Intronbereich und *FASTSNP*, *FANS* sowie *SNPInspector* zur Analyse von Polymorphismen der Promotorregion.

4.4.1 Idiopathisch generalisierte Epilepsien und Photosensitivität

Durch zwei bioinformative Programme (FastSNP und SNPInspector 2.2) wurde die Mutation auf Exon 14 (g.9858211 C>G) als potentiell pathogen eingestuft. Gemäß den Bewertungsalgorithmen der bioinformativen Programme führt der Aminosäureaustausch möglicherweise zur Entstehung einer neuen Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor MZF-1 (Myeloid Zinc Finger Gene). Alle weiteren Polymorphismen wurden als benigne eingestuft.

<i>Lokalisation</i>	<i>Position (NCBI Build37)</i>	<i>PolyPhen2</i>		<i>SIFT</i>		<i>SNAP</i>	
		Score*	Prädiktion	Score	Effekt	Ausmaß	Effekt
Exon 14	g.9858211	0.003	Benigne	0.74	toleriert	78%	Neutral

Tabelle 7a: In Silico-Analysen der Exonregion für Kohorte I (PPR)

Ergebnisse der *In Silico*-Analyse von *non-synonymous* SNPs in den Exonregionen bei der Kohorte I, PPR +/- IGE. Der Aminosäureaustausch wird durch die *in Silico*-Analysen mittels drei verschiedener bioinformativer Programme als neutral eingestuft.

<i>Lokalisation</i>	<i>Position (NCBI Build37)</i>	<i>BDGP</i>	<i>HSF V2.4</i>	
			Wild-Typ	Mutation
5'UTR, Exon 2	g.10275749	Kein Effekt	Kein Unterschied	
Intron 9/10	g.9923799	Kein Effekt	ASS 82.02 DSS 80.32	ASS 53.07 DSS 75.57
Intron 13/14	g.9858894	Kein Effekt	Kein Unterschied	

Tabelle 7b: In Silico-Analysen der Intronregionen für Kohorte I (PPR)

Ergebnisse der *In Silico*-Analysen für die Intronregionen bei Kohorte I, PPR +/- IGE. (ASS = *acceptor splice site*, DSS = *Donor splice site*)

<i>Lokalisation</i>	<i>Position (NCBI Build37)</i>	<i>FastSNP</i>		<i>SNPInspector 2.2</i>	
		<i>Transkriptions- faktor</i>	<i>Score</i>	<i>Transkriptions- faktor</i>	<i>Matrix sim</i>
5'UTR, Promotor	g.10277263	TFBS nicht verändert		Neue Bindungsstelle für EE2F	0.863
5'UTR, Promotor	g.10277068	Bindungsstelle für MZF1	94.8	Neue Bindungsstelle für MZF1	0.991
				Verlust Bdst. für WT1	0.943
				Verlust Bdst. für XCPE1	0.801
5'UTR, Promotor	g.10276998	TFBS nicht verändert		Verlust Bdst. für BCL6	0.76

Tabelle 7c: In Silico-Analysen der Promotorregion für Kohorte I (PPR)

Ergebnisse der *In Silico*-Analysen für die Promotorregion bei Kohorte I, PPR +/- IGE. Der Polymorphismus g.10277068 wird durch zwei bioinformativen Programme als potentiell pathogen eingestuft. (TFBS = *Transcription factor binding site*, EE2F = *eukaryotic translation elongation factor 2*, MZF1 = *myeloid zinc finger 1*, WT1 = *Wilms tumor 1*, XCPE1 = *X core promoter element 1*, BCL6 = *B-cell cll/lymphoma 6*)

4.4.2 Idiopathisch fokale Epilepsien der Rolandischen Region

In der Patientenkohorte idiopathisch fokaler Epilepsien der Rolandischen Region bestätigten *In Silico*-Analysen Hinweise auf eine vermutlich pathogene

Missense Mutation in Exon 4 (g.10032095C>T), die einen Aminosäureaustausch (p.Ala243Val) zur Folge hat.

Lokalisation	Position (NCBI Build37)	PolyPhen2		SIFT		SNAP	
		Score*	Prädiktion	Score	Effekt	Ausmaß	Effekt
Exon 4	g.10032095	0,413	Possibly damaging	0	damaging	78%	Neutral
Exon 14	g.985754	0.015	Benigne	0.3	toleriert	60%	Neutral

Tabelle8a: *In Silico*-Analysen der Exonregionen für Kohorte II (CTS)

Ergebnisse der *in Silico*-Analysen für die Exonregionen bei Kohorte II, Patienten mit idiopathisch fokaler Epilepsie der Rolandischen Region. Der Polymorphismus g10032095 wird durch zwei bioinformativ Programme als potentiell pathogen eingestuft.

Lokalisation	Position (NCBI Build37)	Net Gene 2	Splice view	HSF V2.4	
				Wild-Typ	Mutation
Intron 9/10	g.9927905	Keine Veränderung	Keine Veränderung	DSS 72.76	DSS 45.92
3'UTR	g.9856967	Keine Veränderung	Keine Veränderung	ASS 79.14	ASS 77.89

Tabelle 8b: *In Silico*-Analyse der Intronregionen für Kohorte II (CTS)

Ergebnis der *In Silico*-Analysen für die Intronregionen bei Kohorte II, Patienten mit idiopathisch fokaler Epilepsie der Rolandischen Region. Beide Polymorphismen werden als neutral eingestuft. (ASS = *acceptor splice site*, DSS = *Donor splice site*)

Lokalisation	Position (NCBI Build37)	FastSNP		FANS	
		Transkriptions- faktor	Score	ESS	Risk Level
Exon 4	g.10031884	Sehr geringes Risiko	85,3	ESS motiv not diminished	Very low
Exon 4	g.10031881	Sehr geringes Risiko	85,3	ESE oder ESS motif not diminished	Very low
Exon 14.3	g.9858123	Geringes Risiko	91,0	Conservative change ESE/ESS motif not diminished	Low
Exon 14.2	g.9858155	Geringes Risiko	87,3	Splicing Regulation (protein domain abolished)	High

Tabelle 8c: *In Silico*-Analyse der Transkriptionsfaktorbindungszone für Kohorte II (CTS)

Ergebnis der *In Silico*-Analysen für die Bindungszonen der Transkriptionsfaktoren bei Kohorte II, Patienten mit idiopathisch fokaler Epilepsie der Rolandischen Region; die Polymorphismen werden als neutral eingestuft. (TFBS = *Transcription factor binding site*)

Alle weiteren Polymorphismen wurden durch die bioinformativen Programme als neutral gewertet.

4.5 Kontrollkohorten und klinische Aspekte

4.5.1 Idiopathisch generalisierte Epilepsien und Photosensitivität

Die Validierung des Polymorphismus chr16:g.10277068G>A in der PopGen-Kontrollkohorte mittels eines TaqManTM SNP Assay (Applied Biosystems, USA) ergab einen heterozygoten Status in 3 von 358 Kontrollen. Dies entspricht einer erhöhten Frequenz von 0,4% in der Normalbevölkerung. Für die weiteren identifizierten Polymorphismen ergab sich in den beschriebenen *In Silico*-Analysen kein Anhalt auf funktionelle Relevanz, es erfolgte daher keine Überprüfung in der Kontrollkohorte.

Zusammenfassend konnte in der Kohorte I (PPR) durch Gensequenzierung und anschließende *In Silico*-Analysen keine kausale pathogene Mutation nachgewiesen werden.

4.5.2 Idiopathisch fokale Epilepsien der Rolandischen Region

Der Polymorphismus chr16:g.10032095C>T konnte in der PopGen-Kontrollkohorte von 358 Probanden mittels TaqManTM SNP Assay (Applied Biosystems, USA) nicht nachgewiesen werden.

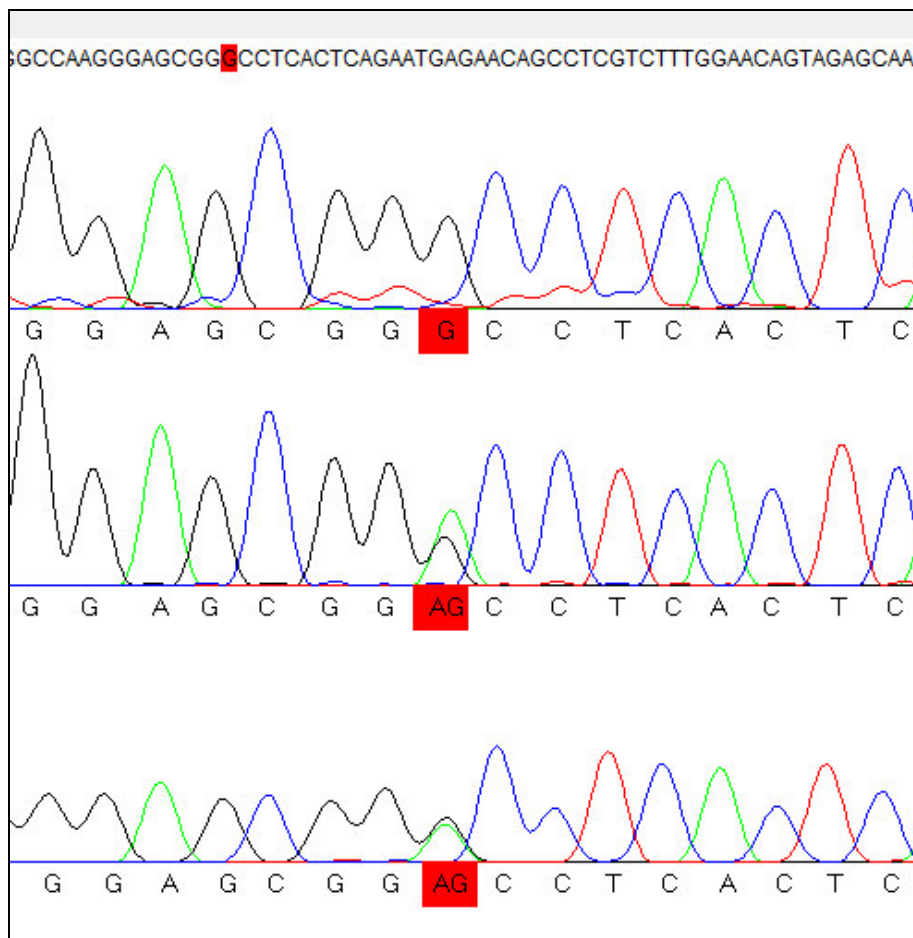


Abbildung 6: Polymorphismus chr 16:g 10032095 C>T

Identifikation des Polymorphismus chr16:g10032095C>T. Ausschnitt aus den Analysen mit Hilfe des internetbasierten, öffentlich zugänglichen Programms NovoSNP 3.0 (Weckx et al. 2005).

Bei dem Patienten (1/39, 2,6%), der Träger der *Missense-Mutation* ist, wurde eine benigne Epilepsie mit zentrottemporalen Spikes (Rolando-Epilepsie, BECTS) und Lernschwierigkeiten diagnostiziert¹². Trotz mehrfacher Kontaktierungsversuche war es nicht möglich die Eltern für die ausstehende Segregationsanalyse rekrutieren zu können.

¹² Motiviert durch die Identifikation der Missense-Mutation (c.728C>T, p.A243V) bei diesem Patienten mit benigner Epilepsie mit zentrottemporalen Spikes und Lernschwierigkeiten erfolgte im Anschluss an diese Arbeit die Rekrutierung weiterer Patientenkohorten zur Validierung und Evaluation der Relevanz dieser Mutation. Die Ergebnisse der Folgestudie durch unsere Arbeitsgruppe wurde 2013 bei *Nature Genetics* veröffentlicht (Lemke et al.2013).

5. Diskussion

5.1 Diskussion der Methoden

5.1.1 Computergestützte Datenanalyse

Genomweite Linkage-Studien sind eine mögliche Methode für die Identifikation neuer Kandidatengene bei Erkrankungen mit komplexer Vererbung. Eine besondere Herausforderung ist dabei die Identifikation geeigneter Kandidatengene innerhalb der meist einige Megabasen umfassenden Linkage-Regionen. Die Auswahl der Gene in vorangegangenen Studien erfolgte subjektiv an Hand der Genfunktion und einem vermuteten Effekt auf die Epileptogenese (Zhu and Zhao, 2007). Bisher konnten keine nennenswerten und reproduzierbaren Effekte der IGE- oder PPR- Kandidatengene gezeigt werden (Lorenz et al 2006; Lorenz et al. 2006; Dibbens et al. 2007; von Spiczak et al. 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine computergestützte Datenanalyse zur Priorisierung von Kandidatengen verwendet. Dies ermöglicht eine effiziente Selektion von neuen Schlüsselkandidatengen. Frei zugängliche, internetbasierte Programme wurden zu einer Erleichterung der Priorisierung von Kandidatengen entwickelt. Mittels derartiger Programme gelingt eine Analyse umfangreicher Datenmengen aus medizinischer Fachliteratur und diversen frei zugänglichen Datenbanken mit Informationen zu Genfunktion, Konservierung, Genstruktur, Proteininteraktionen, Genexpression und weiteren Kriterien.

Die Programme unterscheiden sich neben dem benötigten Input (z.B. benötigt *Endeavour* einen Satz "Trainingsgene", der sich aus bereits identifizierten Genen für Epilepsie zusammensetzt) auch in den Datenquellen, die in die Analyse einbezogen werden und in den Algorithmen und Bewertungskriterien für das eigentliche Ranking der Gene. Um eine möglichst neutrale und objektive Auswahl von Kandidatengen zu gewährleisten, wurden vier

Programme mit unterschiedlichen Datenquellen und Bewertungsalgorithmen in die Analyse einbezogen.

Studien auf der Grundlage computergestützter Datenanalyse zur Priorisierung von Kandidatengenomen existieren auch für andere Krankheitsentitäten mit polygenetischer Vererbung. Priorisierungsstudien wurden unter anderem für das metabolische Syndrom und Diabetes mellitus Typ 2 (Tiffin et al. 2006; Elbers et al. 2007; Tiffin et al. 2008), Osteoporose (Huang et al. 2008) und Autismus (van der Zwaag et al. 2009) durchgeführt.

In einer Folgestudie konnte für die durch bioinformativen Programme identifizierten Osteoporose - Kandidatengene *MATN3* und *IGF1* eine mögliche Beteiligung an Regulationsmechanismen der Knochendichte gezeigt werden (Li et al. 2011).

Neue Methoden wie das *Next Generation Sequencing*¹³ ermöglichen mittlerweile eine Sequenzierung mehrerer Gene, ganzer Linkage-Regionen oder gar des gesamten Exoms oder Genoms – eine Selektion von Kandidatengenomen scheint ob der verbesserten Technik nicht mehr notwendig. *Next Generation Sequencing* ist allerdings weiterhin kostenintensiv und mit einem erhöhten technischen Aufwand verbunden. Eine flächendeckende Verfügbarkeit ist aktuell noch nicht gegeben, auch gibt es noch große Probleme hinsichtlich der Auswertung der großen Datenmengen.

5.1.2 In Silico Analysen

Zur Evaluation der funktionellen Relevanz identifizierter Polymorphismen wurden in dieser Arbeit erneut frei verfügbare, bioinformativen Programme verwendet.

Die Hauptanforderung an bioinformativen Programme zur Selektion pathogener Mutationen besteht in der möglichst zuverlässigen Unterscheidung zwischen potentiell pathogenen Mutationen, die die Proteinfunktion beeinflussen und

¹³ Siehe Anhang

neutralen Veränderungen ohne Effekt auf Proteinfunktion/-struktur (Coassin et al. 2010). Die hier angewandten Programme berücksichtigen charakteristische Sequenz- und/oder Strukturmerkmale. So sind potentiell pathogene Mutationen in der Regel in phylogenetisch und ontogenetisch stark konservierten Zonen lokalisiert. Hinsichtlich der Proteinfunktion sind pathogene Effekte vor allem dann zu erwarten, wenn sich durch die Mutation Änderungen des Ladungsverhaltens ergeben, die Proteinstruktur verändert wird oder für die Proteinfunktion relevante Zonen, wie das aktive Zentrum, Protein-Protein-Bindungszone oder Bindungsstellen betroffen sind (Ng and Henikoff 2003).

In diversen Studien konnte gezeigt werden, dass *In Silico* Analysen wie sie im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurden, geeignet sind, potentiell pathogene Mutationen zu identifizieren. Die Ergebnisse konnten im Rahmen experimenteller Folgestudien bestätigt werden (Chasman and Adams 2001; Zhang et al. 2004).

Dennoch eignen sich die derzeit verfügbaren bioinformativen Programme vor allem zur Identifikation von potentiell pathogenen Mutationen bei Erkrankungen mit monogenetischer Vererbung und komplexen Erkrankungen mit seltenen Mutationen (*common disease – rare variant hypothesis*). Bei der Analyse häufiger genetischer Varianten mit einer Prävalenz ≥ 1 bis 5 % (*common disease – common variant hypothesis*) sind die benutzten bioinformativen Programme nur bedingt anwendbar. Gemäß der heutigen Datenlage treten häufige Varianten in der Regel nicht innerhalb hoch konservierter Zonen auf, sodass eine Unterscheidung und Abgrenzung zu neutralen nsSNPs sich durch die derzeit verfügbaren Programme als deutlich eingeschränkt darstellt (Tchernitchko et al. 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurden, mit der Intention die Verlässlichkeit der Analysen steigern zu können, verschiedene bioinformative Programme kombiniert. Eine potentiell pathogene Mutation wurde als signifikant bewertet, sobald eine Identifikation durch mindestens zwei bioinformative Programme erfolgte.

Durch stetige Weiterentwicklung stellt dieses Verfahren mittlerweile auch bei Erkrankungen mit komplexen Vererbungsmechanismen einen probaten, viel versprechenden Ansatz zur Identifikation relevanter Mutationen für weiterführende Analysen dar. Letztlich ersetzt dieses Verfahren jedoch nicht die funktionelle Analyse genetischer Veränderungen zum Nachweis ihrer pathogenetischen Bedeutung.

Im Hinblick auf mittlerweile verfügbare, genetische Methoden wie dem *next generation sequencing* nimmt die Zahl an neu identifizierten nsSNPs stetig weiter zu. Die Relevanz probater Techniken zur Selektion relevanter, potentiell pathogener Polymorphismen für weiterführende funktionelle Analysen gewinnt somit zukünftig immer mehr an Bedeutung (Ng and Henikoff 2003).

Nicht zuletzt unterstreicht die Verfügbarkeit zahlreicher bioinformativer Programme und die breite Anwendung die Relevanz der hier angewandten Methode für die aktuelle genetische Forschung. Durch Verbesserung der Datenlage in den zu Grunde liegenden Datenbanken und stetiger Weiterentwicklung hat sich dieses Verfahren in der heutigen genetischen Forschung zusehends etabliert.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 *GRIN2A*- probates Kandidatengen für idiopathische Epilepsien

Die computergestützte Datenanalyse ergab sechs Schlüsselkandidatengene für Photosensitivität und idiopathisch generalisierte Epilepsien, darunter *GRIN2A*.

GRIN2A kodiert für die alpha-2-Untereinheit eines ionotropen, glutamatergen, NMDA-Rezeptors. N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) -Rezeptoren sind an der synaptischen Transmission exzitatorischer Neurone im zentralen Nervensystem beteiligt und üben modulierende Effekte auf die neuronale Erregbarkeit und

Plastizität aus (Hollmann and Heinemann 1994). Sie sind dadurch an neurophysiologischen Lernprozessen und Gedächtnisbildung beteiligt. Es handelt sich um heteromere Rezeptoren, die sich aus verschiedenen regulatorischen NR1- und NR2- Untereinheiten zusammensetzen, eine überwiegende Expression von alpha-2- und beta-2-Untereinheiten sind im Bereich des Kortex, Striatum und in hippocampalen Arealen nachweisbar (Goebel and Poosch 1999; Wenzel et al. 1997). Die Rezeptoreigenschaften werden durch die Kombination der verschiedenen Untereinheiten bestimmt (Cull-Candy et al. 2001; Ryan et al. 2012).

NMDA-Rezeptoren sind von zentraler Bedeutung für die Plastizität der neurogenen Synapsen. Das neurogene Remodelling basiert vermutlich auf einer veränderten Zusammensetzung der NMDA-Untereinheiten, während der Reifung von Groß- und Kleinhirn erfolgt ein Wechsel von synaptischen NR2B-haltigen Untereinheiten auf NR2A-haltige Rezeptoruntereinheiten (Dumas 2005).

Eine Beteiligung von NMDA-Rezeptoren an der Pathogenese wird bei verschiedenen neurologischen Krankheitsbildern vermutet. Durch den vermehrten Kalziumeinstrom der NMDA-rezeptoren, der Exzitotoxizität, kommt es zu einer direkten Schädigung des zentralen Nervensystems bei zerebraler Ischämie und Schädelhirntrauma. Die Dysfunktion der NMDA-Rezeptoren spielt eine maßgebliche Rolle in der Pathogenese von chronischen neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, amyotropher Lateralsklerose und Huntingtons Disease und führt dabei zu einer sukzessiven Schädigung der Neuronen (Kalia et al. 2008). Bei Schizophrenie wird hingegen eine Unterfunktion der NMDA-Rezeptor-Einheiten als zu Grunde liegender Pathomechanismus vermutet.

Durch gesteigerte Erregbarkeit und Sensitivierung des zentralen Nervensystems sind gestörte NMDA-Rezeptorfunktionen an der Epileptogenese

beteiligt (Kalia et al. 2008; Goff and Coyle 2001; Hollmann and Heinemann 1994). Insbesondere bei Patienten mit idiopathisch fokalen Epilepsien und geistiger Retardierung konnte durch diverse Arbeitsgruppen eine Beteiligung von *GRIN2A* an der Epileptogenese zeigen (Géczy 2010; Endeley et al. 2010; Reutlinger et al. 2010). Idiopathische Epilepsien zeichnen sich durch ein charakteristisches altersabhängiges Auftreten¹⁴ aus. Ein Wechsel synaptischer NMDA-Rezeptoruntereinheiten erfolgt ebenfalls altersabhängig, sodass sich pathogene Mutationen in NMDA-Rezeptoruntereinheiten vorwiegend in bestimmten Altersgruppen bemerkbar machen können (Paoletti 2011; Henson et al. 2012; Wyllie et al. 2013).

In Studien zu PPR ergaben sich Hinweise auf eine gesteigerte kortikale und subkortikale Erregbarkeit während der Photostimulation. Photosensitivität und Epilepsien mit PPR zeichnen sich durch komplexe funktionelle und strukturelle Netzwerke, die kortikale und subkortikale Areale umfassen, aus (Siniatchkin et al. 2007; Groppa et al. 2008). Neuere Studien weisen auf mikrostrukturelle Veränderungen kortikaler Strukturen und gesteigerter exzitatorischer Neurotransmission hin (Groppa et al. 2012; Moeller et al. 2013). *GRIN2A* ist somit auf Grund der Rezeptorverteilung innerhalb des zentralen Netzwerkes und durch die funktionellen Eigenschaften auch für idiopathisch generalisierte Epilepsien und PPR ein interessantes Kandidatengen.

Aufgrund der funktionellen Eigenschaften von *GRIN2A* und den starken Hinweisen auf eine Beteiligung an der Epileptogenese in voran gegangenen Studien ist die Identifikation von *GRIN2A* als Kandidatengen für idiopathisch fokale Epilepsien, aber auch für idiopathisch generalisierte Epilepsien und PPR plausibel.

¹⁴ Eine Tabelle der genetischen Epilepsien und die entsprechende Altersverteilung findet sich im Anhang.

5.2.2 Sequenzierung und *In Silico*-Analysen

5.2.2.1 Idiopathisch generalisierte Epilepsien

In der Kohorte I (PPR +/- IGE) wurde ein neu identifizierter Polymorphismus durch zwei bioinformative Programme (*FAST SNP* und *SNP Inspector 2.2*) als potentiell pathogen eingestuft. Durch die potentiell pathogene Mutation kommt es zur Entstehung einer neuen Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor *MZF-1* (myeloid zinc finger gene 1).

MZF-1 ist als Transkriptionsfaktor an der Granulopoese, Zellproliferation und Karzinogenese beteiligt (Hromas et al. 1991; Hui et al. 1995). Eine Beteiligung von *MZF-1* konnte bei Prozessen im ZNS und neurologischen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer gezeigt werden (Luo et al. 2009; Porcellini et al. 2013).

In der PopGen-Kontrollkohorte konnte der neu identifizierte Polymorphismus (chr16:g.10277068G>A) allerdings auch bei 3 von 358 Kontrollen nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Frequenz von 0,4% in der Normalbevölkerung. Eine bedeutende Rolle des Polymorphismus bei der Epileptogenese scheint daher eher unwahrscheinlich. Die übrigen Polymorphismen wurden durch die Programme als nicht pathogen eingestuft.

Weitere Analysen sind notwendig um insbesondere die funktionelle Relevanz einer möglichen neuen Bindungsstelle für *MZF-1* und die Bedeutung von *GRIN2A* bei der Genese von idiopathisch generalisierten Epilepsien zu untersuchen.

5.2.2.2 Idiopathisch fokale Epilepsien

In der Kohorte II (CTS) wurde die Missense Mutation auf Exon 4 (g.10032095C>T) durch zwei bioinformative Programme als potentiell pathogen eingestuft. In der Kontrollkohorte von 358 gesunden Probanden konnte der Polymorphismus nicht nachgewiesen werden.

Die genetischen Grundlagen bei idiopathisch fokalen Epilepsien sind nach wie vor weitgehend unbekannt (siehe oben). Unter Berücksichtigung von

Rezeptorfunktion und Genexpression unterstreicht der im Rahmen dieser Arbeit identifizierte potentiell pathogene Polymorphismus zusammen mit den im Vorfeld dieser Arbeit identifizierten überlappenden Mikrodeletionen (Reutlinger et al. 2010) die Bedeutung von *GRIN2A* als mögliches Kandidatengen bei idiopathisch fokalen Epilepsien der Rolandischen Region.

5.3 Limitierungen der Arbeit

Durch Kombination unabhängiger bioinformativer Programme erfolgte die objektive Identifikation eines neuen, viel versprechenden Kandidatengens für idiopathische Epilepsien. *GRIN2A* wurde unter den ermittelten Kandidatengenen auf Grund der funktionellen Eigenschaften und Hinweisen für eine mögliche Beteiligung von *GRIN2A* an der Epileptogenese als Schlüssel-Kandidatengen ausgewählt. Letztendlich konnte in der Kohorte I (PPR) keine kausale Mutation im Genbereich *GRIN2A* identifiziert werden. Die Effektivität dieses Vorgehens für die Epilepsiegenetik konnte somit noch nicht endgültig belegt werden - weitere Studien sind hier notwendig.

Die Studienkohorte I (PPR) umfasste insgesamt 48 Patienten. Dabei bestand bei 26 Patienten die Diagnose einer idiopathisch generalisierten Epilepsie, 22 Patienten wiesen bei leerer Anfallsanamnese lediglich das EEG-Merkmal Photosensitivität auf. Die IGE-Patienten wiesen zudem heterogene IGE-Phänotypen mit unterschiedlichen Anfallsarten (Absence-Epilepsien, EGTCS und Myoklonus-Epilepsien) auf. Aufgrund der kleinen Patientenzahl und der damit verbundenen geringen statistischen Power sind weitere, multizentrische Analysen mit ausreichend großen, gut charakterisierten Patientenkohorten notwendig, um die Bedeutung von genetischen Veränderungen im Bereich von *GRIN2A* näher bestimmen zu können.

Neuere Studien deuten auf eine Beteiligung von *MZF-1* bei Prozessen im zentralen Nervensystem hin (Luo et al. 2009; Porcellini et al. 2013). Es sollten daher weitere Analysen erfolgen, um die funktionelle Relevanz einer möglichen

neuen *MZF-1*-Bindungsstelle bei der Genese von idiopathisch generalisierten Epilepsien zu untersuchen.

Auf Grund überlappender Mikrodeletionen bei drei Indexpatienten mit komplexen Epilepsiephänotypen der Rolandischen Region mit (Sprach-) Entwicklungsverzögerung und geistiger Retardierung (Reutlinger et al. 2010), wurde *GRIN2A* als Kandidatengen bei Patienten mit idiopathisch fokalen Epilepsiesyndromen der Rolandischen Region mit CTS ausgewählt. Die Patientenkohorte II (CTS) umfasste ausschließlich Patienten mit milden Epilepsiephänotypen. Patienten mit komplexeren Epilepsiephänotypen, Entwicklungsverzögerung, oder geistiger Retardierung wurden in dieser Arbeit nicht untersucht.

Basierend auf dieser Arbeit konnten in einer Folgestudie unserer Forschungsgruppe bei Patienten mit Landau-Kleffner-Syndrom, atypischer Rolando-Epilepsie, sowie komplexen Epilepsiephänotypen der Rolandischen Region, begleitet von (Sprach-) Entwicklungsverzögerung und geistiger Behinderung signifikant höhere Mutationsraten im Bereich von *GRIN2A* nachgewiesen werden (Lemke et al. 2013).

Auch in zwei weiteren Studien konnten signifikant höhere Mutationsraten zwischen 7 und 20% nachgewiesen werden (Lesca et al. 2012; Carvill et al. 2013).

Im Rahmen dieser Arbeit gelang die Identifikation einer potentiell pathogenen Mutation bei nur einem Indexpatienten (1/39, 2,6%). Dies deutet darauf hin, dass Mutationen im Bereich der regulatorischen Untereinheit *GRIN2A* tendenziell zu schwereren Epilepsiephänotypen begleitet von (Sprach-) Entwicklungsverzögerung und geistiger Retardierung führen.

5.4 Funktionelle Relevanz der Ergebnisse und Ausblick

Zur Evaluation der Relevanz neu identifizierter Polymorphismen sind funktionelle Analysen notwendig. Im Anschluss an diese Arbeit wurde daher

durch die Arbeitsgruppe von PD Dr. M. Schwake am Institut für Biochemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, die Lokalisation der Missense Mutation p.Ala243Val im Proteinmodell und deren mögliche Effekte auf die Rezeptorfunktion untersucht¹⁵.

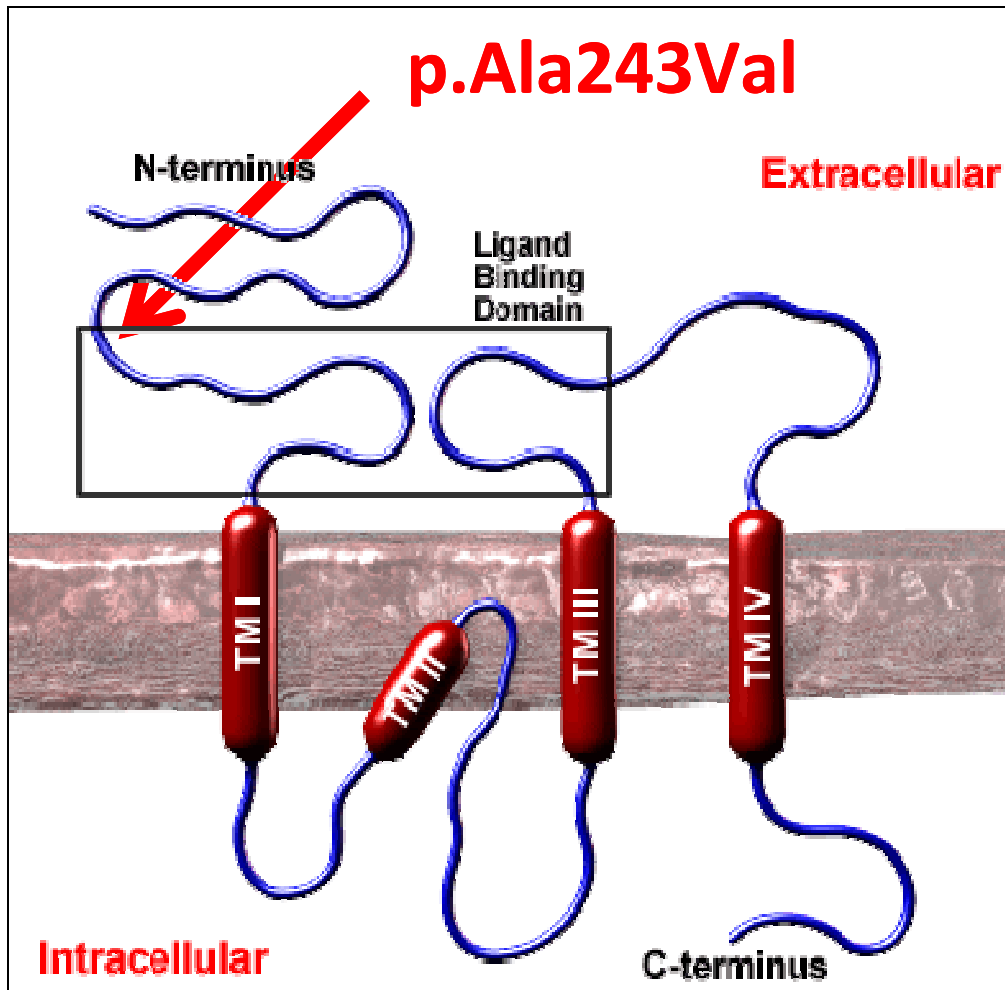


Abbildung 7: Protein-Modell zur Lokalisation der Mutation p.Ala243Val

Lokalisation der in dieser Arbeit identifizierten Mutation p.Ala243Val bei einem Patienten mit BECTS, Verhaltensauffälligkeiten und Lernschwierigkeiten im Proteinmodell. Abbildung: Institut für Biochemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel; Arbeitsgruppe PD Dr. Michael Schwake.

Die neu identifizierte Missense Mutation befindet sich im Bereich der Bindungsstelle für Zink. Mittels Patch clamp Technik wurde der Effekt der pathogenen Mutation auf Rezeptorfunktion, Leitfähigkeit und

¹⁵ Die Ergebnisse der funktionellen Analysen wurden 2013 durch unsere Forschungsgruppe bei Nature Genetics veröffentlicht (Lemke et al. 2013).

Öffnungsverhalten untersucht. In Vitro ergeben sich bei Froschoozyten Hinweise auf eine signifikante Reduktion der hoch affinen Zink vermittelten Rezeptorinaktivierung.

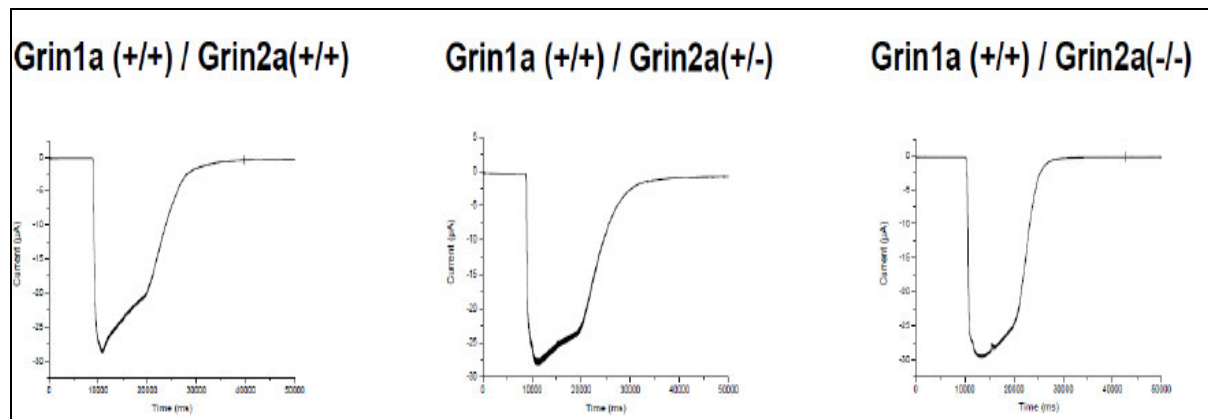


Abbildung 8: Messungen des Öffnungsverhaltens

Erste Auswertung der neurophysiologischer Daten für die Mutation p.Ala243Val gemessen bei -70mV unter Gabe von Glutamin/Glycin. Die Messungen wurden am Institut für Biochemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durch die Arbeitsgruppe um PD Dr. Michael Schwake durchgeführt. Vergleiche Abb. 1e (Lemke et al., 2013)

Durch die verminderte tonische Inhibition des NR1/NR2A^{A243V} Rezeptors führt dies vermutlich *in vivo* und unter physiologischen Konzentrationen von Zink zu einer gesteigerten Rezeptoraktivierung mit verstärktem Calciumeinstrom (Lemke et al. 2013).

6. Zusammenfassung

Große Herausforderungen auf dem Gebiet der Epilepsiegenetik stellen bei der Identifikation neuer Kandidatengene die komplexen Vererbungsmechanismen und variablen Phänotypen dar. Durch Kombination moderner Ansätze wie der Verwendung von Endophänotypen, einer computergestützten Analyse von Kandidatengenen und etablierter molekulargenetischer Methoden konnte mit *GRIN2A* erfolgreich ein vielversprechendes Kandidatengen für idiopathische (genetische) Epilepsien im Kindesalter identifiziert werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit erfolgte die Gensequenzierung aller Exone, Exon-Intron-Überlappungsbereiche sowie der Promotorregion von *GRIN2A* bei zwei Patientenkohorten. Während in der Kohorte I (PPR +/- IGE) keine kausale Mutation identifiziert werden konnte, gelang in Kohorte II (BECTS + ABPE) die Identifikation einer durch *In Silico*-Analysen als pathogen eingestuften Mutation, deren funktionelle Bedeutung in nachfolgenden Studien gezeigt werden konnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen zusammen mit den Resultaten weiterer Arbeitsgruppen eine maßgebliche Beteiligung von *GRIN2A* an der Epileptogenese, vor allem idiopathisch fokaler Epilepsien der Rolandischen Region nahe. Im Anschluss an diese Arbeit konnten funktionelle Analysen erste Hinweise auf eine gestörte Rezeptorinaktivierung liefern. Weitere Studien sind notwendig, um das pathophysiologische Verständnis zu verbessern.

Epilepsie wird heute nicht länger als „göttliche Bestrafung“ oder mystisch angesehen. Die komplexen Mechanismen der Epileptogenese sind jedoch weiterhin weitgehend unverstanden. Große Herausforderungen an die heutige Forschung bestehen in der Entschlüsselung genetischer Grundlagen um das pathophysiologische Verständnis zu verbessern und damit zukünftig neue Therapieansätze für Epilepsien entwickeln zu können.

7. Literaturverzeichnis

- Adelöw, C., Andell, E., Amark, P., Andersson, T., Hellebro, E., Ahlbom, A., Tomson, T., (2009) Newly diagnosed single unprovoked seizures and epilepsy in Stockholm, Sweden: First report from the Stockholm Incidence Registry of Epilepsy (SIRE). *Epilepsia*, 50(5), S.1094–1101.
- Adie, E.A., Adams, R.R., Evans, K.L., Porteous, D.J., Pickard, B.S., (2006) SUSPECTS: enabling fast and effective prioritization of positional candidates. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 22(6), S.773–774.
- Adie, E.A., Adams, R.R., Evans, K.L., Porteous, D.J., Pickard, B.S., (2005) Speeding disease gene discovery by sequence based candidate prioritization. *BMC Bioinformatics*, 6, S.55.
- Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A.S., Sunyaev, S.R., (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods*, 7(4), S.248–249.
- Aerts, S., Lambrechts, D., Maity, S., Van Loo, P., Coessens, B., De Smet, F., Tranchevent, L.C., De Moor, B., Marynen, P., Hassan, B., Carmeliet, P., Moreau, Y., (2006) Gene prioritization through genomic data fusion. *Nature Biotechnology*, 24(5), S.537–544.
- Appleton, R., Beirne, M., Acomb, B., (2000) Photosensitivity in juvenile myoclonic epilepsy. *Seizure*, 9(2), S.108–111.
- Bali, B., Kull, L.L., Strug, L.J., Clarke, T., Murphy, P.L., Akman, C.I., Greenberg, D.A., Pal, D.K., (2007) Autosomal dominant inheritance of centrotemporal sharp waves in rolandic epilepsy families. *Epilepsia*, 48(12), S.2266–2272.
- Berg, A.T., Berkovic, S.F., Brodie, M.J., Buchhalter, J., Cross, J.H., van Emde Boas, W., Engel, J., French, J., Glauser, T.A., Mathern, G.W., Moshé, S.L., Nordli, D., Plouin, P., Scheffer, I.E., (2010) Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*, 51(4), S.676–685.
- Berkovic, S.F., Howell, R.A., Hay, D.A., Hopper, J.L., (1998) Epilepsies in twins: genetics of the major epilepsy syndromes. *Annals of Neurology*, 43(4), S.435–445.
- Bromberg, Y., Rost, B., (2007) SNAP: predict effect of non-synonymous polymorphisms on function. *Nucleic Acids Research*, 35(11), S.3823–3835.
- Bromberg, Y., Yachdav, G., Rost, B., (2008) SNAP predicts effect of mutations on protein function. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 24(20), S.2397–2398.

- Cannon, T., Keller, M.C., (2006) Endophenotypes in the genetic analyses of mental disorders. *Annual Review of Clinical Psychology*, 2, S.267–290.
- Cartharius, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, B., Haltmeier, M., Klingenhoff, A., Frisch, M., Bayerlein, M., Werner, T., (2005) MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 21(13), S.2933–2942.
- Carvill, G.L., Regan, B.M., Yendle, S.C., O'Roak, B.J., Lozovaya, N., Bruneau, N., Burnashev, N., Khan, A., Cook, J., Geraghty, E., Sadleir, L.G., Turner, S.J., Tsai, M.H., Webster, R., Ouvrier, R., Damiano, J.A., Berkovic, S.F., Shendure, J., Hildebrand, M.S., Szepetowski, P., Scheffer, I.E., Mefford, H.C., (2013) GRIN2A mutations cause epilepsy-aphasia spectrum disorders. *Nature genetics*, 45(9), S.1073–1076.
- Chasman, D., Adams, R.M., (2001) Predicting the functional consequences of non-synonymous single nucleotide polymorphisms: structure-based assessment of amino acid variation. *Journal of Molecular Biology*, 307(2), S.683–706.
- Coassin, S., Brandstätter, A., Kronenberg, F., (2010) Lost in the space of bioinformatic tools: a constantly updated survival guide for genetic epidemiology. The GenEpi Toolbox. *Atherosclerosis*, 209(2), S.321–335.
- Cossette, P., Liu, L., Brisebois, K., Dong, H., Lortie, A., Vanasse, M., Saint-Hilaire, J.M., Carmant, L., Verner, A., Lu, W.Y., Wang, Y.T., Rouleau, G.A., (2002) Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. *Nature Genetics*, 31(2), S.184–189.
- Covanis, A., (2005) Photosensitivity in idiopathic generalized epilepsies. *Epilepsia*, 46 Suppl 9, S.67–72.
- Creutz, W., (1934) *Die Neurologie des 1.-7. Jahrhunderts n. Chr: eine historisch-neurologische Studie*, G. Thieme.
- Cull-Candy, S., Brickley, S., Farrant, M., (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(3), S.327–335.
- Desmet, F.O., Hamroun, D., Lalande, M., Collod-Bérout, G., Claustres, M., Bérout, C., (2009). Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Research*, 37(9), S.e67.
- Dibbens, L.M., Ekberg, J., Taylor, I., Hodgson, B.L., Conroy, S.J., Lensink, I.L., Kumar, S., Zielinski, M.A., Harkin, L.A., Sutherland, G.R., Adams, D.J., Berkovic, S.F., Scheffer, I.E., Mulley, J.C., Poronnik, P., (2007) NEDD4-2 as a potential candidate susceptibility gene for epileptic photosensitivity. *Genes, Brain, and Behavior*, 6(8), S.750–755.
- Donald Shields, W., Carter, S.O., (2009) Benign epilepsy with centrotemporal spikes. *Epilepsia*, 50, S.10–15.

- Dumas, T.C., (2005) Developmental regulation of cognitive abilities: modified composition of a molecular switch turns on associative learning. *Progress in Neurobiology*, 76(3), S.189–211.
- Durner, M., Keddache, M.A., Tomasini, L., Shinnar, S., Resor, S.R., Cohen, J., Harden, C., Moshe, S.L., Rosenbaum, D., Kang, H., Ballaban-Gil, K., Hertz, S., Labar, D.R., Luciano, D., Wallace, S., Yohai, D., Klotz, I., Dicker, E., Greenberg, D.A., (2001) Genome scan of idiopathic generalized epilepsy: evidence for major susceptibility gene and modifying genes influencing the seizure type. *Annals of Neurology*, 49(3), S.328–335.
- Elbers, C.C., Onland-Moret, N.C., Franke, L., Niehoff, A.G., van der Schouw, Y.T., Wijmenga, C., (2007) A strategy to search for common obesity and type 2 diabetes genes. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 18(1), S.19–26.
- Endele, S., Rosenberger, G., Geider, K., Popp, B., Tamer, C., Stefanova, I., Milh, M., Kortüm, F., Fritsch, A., Pientka, F.K., Hellenbroich, Y., Kalscheuer, V.M., Kohlhase, J., Moog, U., Rappold, G., Rauch, A., Ropers, H.H., von Spiczak, S., Tönnies, H., Villeneuve, N., Villard, L., Zabel, B., Zenker, M., Laube, B., Reis, A., Wieczorek, D., Van Maldergem, L., Kutsche, K., (2010) Mutations in GRIN2A and GRIN2B encoding regulatory subunits of NMDA receptors cause variable neurodevelopmental phenotypes. *Nature Genetics*, 42(11), S.1021–1026.
- Engel, J. (2001) A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia*, 42(6), S.796–803.
- Fisher, R.S., van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., Engel, J. Jr., (2005) Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 46(4), S.470–472.
- Fisher, R.S., Harding, G., Erba, G., Barkley, G.L., Wilkins, A., (2005) Photic- and pattern-induced seizures: a review for the Epilepsy Foundation of America Working Group. *Epilepsia*, 46(9), S.1426–1441.
- Fisher, R.S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J.H., Elger, C.E., Engel, J. Jr, Forsgren, L., French, J.A., Glynn, M., Hesdorffer, D.C., Lee, B.I., Mathern, G.W., Moshé, S.L., Perucca, E., Scheffer, I.E., Tomson, T., Watanabe, M., Wiebe, S., (2014) A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55(4), S.475–482.
- Franke, A., Balschun, T., Karlsen, T.H., Sventoraityte, J., Nikolaus, S., Mayr, G., Domingues, F.S., Albrecht, M., Nothnagel, M., Ellinghaus, D., Sina, C., Onnie, C.M., Weersma, R.K., Stokkers, P.C., Wijmenga, C., Gazouli, M., Strachan, D., McArdle, W.L., Vermeire, S., Rutgeerts, P., Rosenstiel, P., Krawczak, M.,

- Vatn, M.H., IBSEN study group, Mathew, C.G., Schreiber, S., (2008) Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nature Genetics*, 40(11), S.1319–1323.
- Franke, L., van Bakel, H., Fokkens, L., de Jong, E.D., Egmont-Petersen, M., Wijmenga, C., (2006) Reconstruction of a functional human gene network, with an application for prioritizing positional candidate genes. *American Journal of Human Genetics*, 78(6), S.1011–1025.
- Géczy, J., (2010) Glutamate receptors and learning and memory. *Nature Genetics*, 42(11), S.925–926.
- Goebel, D.J., Poosch, M.S., (1999) NMDA receptor subunit gene expression in the rat brain: a quantitative analysis of endogenous mRNA levels of NR1Com, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D and NR3A. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 69(2), S.164–170.
- Goff, D.C., Coyle, J.T., (2001) The emerging role of glutamate in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *The American Journal of Psychiatry*, 158(9), S.1367–1377.
- Gottesman, I.I., Gould, T.D., (2003) The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *The American Journal of Psychiatry*, 160(4), S.636–645.
- Grensemann, H., (1968) *Die hippokratische Schrift über die heilige Krankheit*, Walter de Gruyter.
- Groppa, S., Siebner, H.R., Kurth, C., Stephani, U., Siniatchkin, M., (2008) Abnormal response of motor cortex to photic stimulation in idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsia*, 49 (12) S. 2022-2029.
- Groppa, S., Moeller, F., Siebner, H., Wolff, S., Riedel, C., Deuschl, G., Stephani, U., Siniatchkin, M., (2012) White matter microstructural changes of thalamocortical networks in photosensitivity and idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsia*, 53 (4) S. 668-676.
- Hahn, A., Pistohl, J., Neubauer, B.A., Stephani, U., (2001) Atypical „benign“ partial epilepsy or pseudo-Lennox syndrome. Part I: symptomatology and long-term prognosis. *Neuropediatrics*, 32(1), S.1–8.
- Hauser, W.A., Annegers, J.F., Kurland, L.T., (1993) Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935-1984. *Epilepsia*, 34(3), S.453–468.
- Helbig, I., Scheffer, I.E., Mulley, J.C., Bercovic, S.F., (2008) Navigating the channels and beyond: unravelling the genetics of the epilepsies. *Lancet Neurology*, 7(3), S.231–245.

- Helm, R.W.O., (1977) *Schriften und Quellen der Alten Welt* D. A. der W. zu B. S. für Altertumswissenschaft, A. der W. der D. A. für A. G. und Archäologie, & D. A. der W. zu B. Z. für A. G. und Archäologie, hrsg., Akademie-Verlag.
- Hempelmann, A., Taylor, K.P., Heils, A., Lorenz, S., Prud'homme, J.F., Nabbout, R., Dulac, O., Rudolf, G., Zara, F., Bianchi, A., Robinson, R., Gardiner, R.M., Covanis, A., Lindhout, D., Stephani, U., Elger, C.E., Weber, Y.G., Lerche, H., Nürnberg, P., Kron, K.L., Scheffer, I.E., Mulley, J.C., Berkovic, S.F., Sander, T., (2006) Exploration of the genetic architecture of idiopathic generalized epilepsies. *Epilepsia*, 47(10), S.1682–1690.
- Henson, M.A., Larsen, R.S., Lawson, S.N., Pérez-Otario, I., Nakanishi, N., Lipton, S.A., Philpot, B.D., (2012) Genetic Deletion of NR3A Accelerates Glutamatergic Synapse Maturation L. Groc, hrsg. *PLoS ONE*, 7(8), S.e42327.
- Hollmann, M., Heinemann, S., (1994) Cloned glutamate receptors. *Annual Review of Neuroscience*, 17, S.31–108.
- Hromas, R., Collins, S.J., Hickstein, D., Raskind, W., Deaven, L.L., O'Hara, P., Hagen F.S., Kaushansky, K., (1991) A retinoic acid-responsive human zinc finger gene, MZF-1, preferentially expressed in myeloid cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(22), S.14183–14187.
- Huang, Q.Y., Li, G.H., Cheung, W.M., Song, Y.Q., Kung, A.W., (2008) Prediction of osteoporosis candidate genes by computational disease-gene identification strategy. *Journal of Human Genetics*, 53(7), S.644–655.
- Hui, P., Guo, X., Bradford, P.G., (1995) Isolation and functional characterization of the human gene encoding the myeloid zinc finger protein MZF-1. *Biochemistry*, 34(50), S.16493–16502.
- Jallon, P., Latour, P., (2005) Epidemiology of idiopathic generalized epilepsies. *Epilepsia*, 46 Suppl 9, S.10–14.
- Janz, D., (1966) *Jahrbuch für Psychologie, Psychotherapie und medizinische Anthropologie; Leitbilder der Epilepsie bei Hippokrates und Paracelsus* Görres-Gesellschaft, hrsg., K. Alber.
- Kalia, L., (2008) NMDA Receptors in Clinical Neurology: Excitatory Times Ahead. *Lancet Neurol*, 7(8), S.742-755.
- Kawabata, T., Ota, M., Nishikawa, K., (1999) The Protein Mutant Database. *Nucleic Acids Research*, 27(1), S.355–357.
- de Kovel, C.G., Pinto, D., Tauer, U., Lorenz, S., Muhle, H., Leu, C., Neubauer, B.A., Hempelmann, A., Callenbach, P.M., Scheffer, I.E., Berkovic, S.F., Rudolf, G., Striano, P., Siren, A., Baykan, B., Sander, T., Lindhout, D., Kasteleijn-Nolst Trenité, D.G., Stephani, U., Koeleman, B.P., (2010) Whole-genome linkage

- scan for epilepsy-related photosensitivity: a mega-analysis. *Epilepsy Research*, 89(2-3), S.286–294.
- Kryukov, G.V., Pennacchio, L.A., Sunyaev, S.R., (2007) Most rare missense alleles are deleterious in humans: implications for complex disease and association studies. *American Journal of Human Genetics*, 80(4), S.727–739.
- Kumar, P., Henikoff, S., Ng, P.C., (2009) Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature Protocols*, 4(7), S.1073–1081.
- Lemke, J.R., Lal, D., Reinthaler, E., Steiner, I., Nothnagel, M., Alber, M., Geider, K., Laube, B., Schwake, M., Finsterwalder, K., Franke, A., Schilhabel, M., Jähn, J.A., Muhle, H., Boor, R., van Paesschen, W., Caraballo, R., Fejerman, N., Weckhuysen, S., de Jonghe, P., Larsen, J., Møller, R.S., Hjalgrim, H., Addis, L., Tang, S., Hughes, E., Pall, D.K., Veri, K., Vaher, U., Talvik, T., Dimova, P., López, R.G., Serratosa, J.M., Linnankivi, T., Lehesjoki, A.E., Ruf, S., Wolff, M., Buerki, S., Wohlrab, G., Kroell, J., Datta, A.N., Fiedler, B., Kurlermann, G., Kluger, G., Hahn, A., Haberlandt, D.E., Kutzer, C., Sperner, J., Becker, F., Weber, Y.G., Feucht, M., Steinböck, H., Neophythou, B., Ronen, G.M., Gruber-Sedlmayr, U., Geldner, J., Harvey, R.J., Hoffmann, P., Herms, S., Altmüller, J., Toliat, M.R., Thiele, H., Nürnberg, P., Wilhelm, C., Stephani, U., Helbig, I., Lerche, H., Zimprich, F., Neubauer, B.A., Biskup, S., von Spiczak, S., (2013) Mutations in GRIN2A cause idiopathic focal epilepsy with rolandic spikes. *Nature genetics*, 45(9), S.1067–1072.
- Lesca, G., Rudolf, G., Labalme, A., Hirsch, E., Arzimanoglou, A., Genton, P., Motte, J., de Saint Martin, A., Valenti, M.P., Boulay, C., De Bellescize, J., Kéo-Kosal, P., Boutry-Kryza, N., Ederly, P., Sanlaville, D., Szepetowski, P., (2012) Epileptic encephalopathies of the Landau-Kleffner and continuous spike and waves during slow-wave sleep types: Genomic dissection makes the link with autism. *Epilepsia*, 53(9), S.1526–1538.
- Leu, C., de Kovel, C.G., Zara, F., Striano, P., Pezzella, M., Robbiano, A., Bianchi, A., Bisulli, F., Coppola, A., Giallonardo, A.T., Beccaria, F., Trenité, D.K., Lindhout, D., Gaus, V., Schmitz, B., Janz, D., Weber, Y.G., Becker, F., Lerche, H., Kleefuss-Lie, A.A., Hallman, K., Kunz, W.S., Elger, C.E., Muhle, H., Stephani, U., Møller, R.S., Hjalgrim, H., Mullen, S., Scheffer, I.E., Berkovic, S.F., Everett, K.V., Gardiner, M.R., Marini, C., Guerrini, R., Lehesjoki, A.E., Siren, A., Nabbout, R., Baulac, S., Leguern, E., Serratosa, J.M., Rosenow, F., Feucht, M., Unterberger, I., Covanis, A., Suls, A., Weckhuysen, S., Kaneva, R., Caglayan, H., Turkdogan, D., Baykan, B., Bebek, N., Ozbek, U., Hempelmann, A., Schulz, H., Rüschendorf, F., Trucks, H., Nürnberg, P., Avanzini, G., Koeleman, B.P., Sander, T., (2012) Genome-wide linkage meta-analysis identifies susceptibility loci at 2q34 and 13q31.3 for genetic generalized epilepsies. *Epilepsia*, 53(2), S.308–318.

- Li, G.H., Deng, H.W., Kung, A.W., Huang, Q.Y., (2011) Identification of genes for bone mineral density variation by computational disease gene identification strategy. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 29(6), S.709–716.
- Lorenz, S., Taylor, K.P., Gehrmann, A., Becker, T., Muhle, H., Gresch, M., Tauer, U., Sander, T., Stephani, U., (2006) Association of BRD2 polymorphisms with photoparoxysmal response. *Neuroscience Letters*, 400(1-2), S.135–139.
- Lorenz, S., Heils, A., Taylor, K.P., Gehrmann, A., Muhle, H., Gresch, M., Becker, T., Tauer, U., Stephani, U., Sander, T., (2006) Candidate gene analysis of the succinic semialdehyde dehydrogenase gene (ALDH5A1) in patients with idiopathic generalized epilepsy and photosensitivity. *Neuroscience Letters*, 397(3), S.234–239.
- Luo, X., Zhang, X., Shao, W., Yin, Y., Zhou, J., (2009) Crucial roles of MZF-1 in the transcriptional regulation of apomorphine-induced modulation of FGF-2 expression in astrocytic cultures. *Journal of Neurochemistry*, 108(4), S.952–961.
- Moeller, F., Muthuraman, M., Stephani, U., Deuschl, G., Raethjen, J., Siniatchkin, M., (2013) Representation and propagation of epileptic activity in absences and generalized photoparoxysmal responses. *The Human Brain Mapping* 53 (4), S. 1896-1909.
- Mulley, J.C., Scheffer, I.E., Harkin, L.A., Berkovic, S.F., Dibbens, L.M., (2005) Susceptibility genes for complex epilepsy. *Human Molecular Genetics*, 14 Spec No. 2, S.R243–249.
- Neubauer, B.A., Fiedler, B., Himmelein, B., Kämpfer, F., Lässker, U., Schwabe, G., Spanier, I., Tams, D., Bretscher, C., Moldenhauer, K., Kurlemann, G., Weise, S., Tedroff, K., Eeg-Olofsson, O., Wadelius, C., Stephani, U., (1998) Centrotemporal spikes in families with rolandic epilepsy: linkage to chromosome 15q14. *Neurology*, 51(6), S.1608–1612.
- Neubauer, B.A., Waldegger, S., Heinzinger, J., Hahn, A., Kurlemann, G., Fiedler, B., Eberhard, F., Muhle, H., Stephani, U., Garkisch, S., Eeg-Olofsson, O., Müller, U., Sander, T., (2008) KCNQ2 and KCNQ3 mutations contribute to different idiopathic epilepsy syndromes. *Neurology*, 71(3), S.177–183.
- Ng, P.C., Henikoff, S., (2003) SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Research*, 31(13), S.3812–3814.
- Nishikawa, K., Ishino, S., Takenaka, H., Norioka, N., Hirai, T., Yao, T., Seto, Y., (1994) Constructing a protein mutant database. *Protein Engineering*, 7(5), S.733.

- ILAE, 1989. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia*, 30(4), S.389-399.
- Pal, D.K., Li, W., Clarke, T., Lieberman, P., Strug, L.J., (2010) Pleiotropic effects of the 11p13 locus on developmental verbal dyspraxia and EEG centrotemporal sharp waves. *Genes, Brain and Behavior*, 9(8), S.1004–1012.
- Paoletti, P., (2011) Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *European Journal of Neuroscience*, 33(8), S.1351–1365.
- Perez-Iratxeta, C., Wjst, M., Bork, P., Andrade, M.A., (2005) G2D: a tool for mining genes associated with disease. *BMC Genetics*, 6, S.45.
- Perez-Iratxeta, C., Bork, P., Andrade-Navarro, M.A., (2007) Update of the G2D tool for prioritization of gene candidates to inherited diseases. *Nucleic Acids Research*, 35(Web Server issue), S.W212–216.
- Pinto, D., Kasteleijn-Nolst Trenité, D.G., Cordell, H.J., Mattheisen, M., Strauch, K., Lindhout, D., Koeleman, B.P., (2007) Explorative two-locus linkage analysis suggests a multiplicative interaction between the 7q32 and 16p13 myoclonic seizures-related photosensitivity loci. *Genetic Epidemiology*, 31(1), S.42–50.
- Porcellini, E., Carbone, I., Martelli, P.L., Ianni, M., Casadio, R., Pession, A., Licastro, F., (2013) Haplotype of Single Nucleotide Polymorphisms in Exon 6 of the MZF-1 Gene and Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 34(2), S.439–447.
- Ramensky, V., Bork, P., Sunyaev, S., (2002) Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Research*, 30(17), S.3894–3900.
- Reese, M.G., Eeckman, F.H., Kulp, D., Haussler, D., (1997) Improved splice site detection in Genie. *Journal of Computational Biology: A Journal of Computational Molecular Cell Biology*, 4(3), S.311–323.
- Reich, D.E., Lander, E.S., (2001) On the allelic spectrum of human disease. *Trends Genet* 17, S. 502 - 510
- Reutlinger, C., Helbig, I., Gawelczyk, B., Subero, J.I., Tönnies, H., Muhle, H., Finsterwalder, K., Vermeer, S., Pfundt, R., Sperner, J., Stefanova, I., Gillessen-Kaesbach, G., von Spiczak, S., van Baalen, A., Boor, R., Siebert, R., Stephani, U., Caliebe, A., (2010) Deletions in 16p13 including GRIN2A in patients with intellectual disability, various dysmorphic features, and seizure disorders of the rolandic region. *Epilepsia*. 51(9):1870-3
- Ryan, T.J., Kopanitsa, M.V., Indersmitten, T., Nithianantharajah, J., Afinowi, N.O., Pettit, C., Stanford, L.E., Sprengel, R., Saksida, L.M., Bussey, T.J., O'Dell, T.J., Grant, S.G., Komiyama, N.H., (2012) Evolution of GluN2A/B cytoplasmic

- domains diversified vertebrate synaptic plasticity and behavior. *Nature Neuroscience*, 16(1), S.25–32.
- Schneble, H., (2003) *Heillos, heilig, heilbar: die Geschichte der Epilepsie von den Anfängen bis heute*, Walter de Gruyter Verlag, Berlin.
- Siniatchkin, M., Moeller, F., Shepherd, A., Siebner, H., Stephani, U., (2007) Altered cortical visual processing in individuals with a spreading photoparoxysmal EEG response. *The European Journal of Neuroscience*, 26(2), S.529–536.
- von Spiczak, S., Muhle, H., Helbig, I., de Kovel, C.G., Hampe, J., Gaus, V., Koeleman, B.P., Lindhout, D., Schreiber, S., Sander, T., Stephani, U., (2010) Association study of TRPC4 as a candidate gene for generalized epilepsy with photosensitivity. *Neuromolecular Medicine*, 12(3), S.292–299.
- von Spiczak, S., Finsterwalder, K., Muhle, H., Franke, A., Schilhabel, M., Stephani, U., Helbig, I., (2011) Comprehensive analysis of candidate genes for photosensitivity using a complementary set of bioinformatic tools and experimental methods. *Epilepsia*, 52(10) 143-147.
- Strug, L.J., Clarke, T., Chiang, T., Chien, M., Baskurt, Z., Li, W., Dorfman, R., Bali, B., Wirrell, E., Kugler, S.L., Mandelbaum, D.E., Wolf, S.M., McGoldrick, P., Hardison, H., Novotny, E.J., Ju, J., Greenberg, D.A., Russo, J.J., Pal, D.K., (2009) Centrottemporal sharp wave EEG trait in rolandic epilepsy maps to Elongator Protein Complex 4 (ELP4). *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 17(9), S.1171–1181.
- Tauer, U., Lorenz, S., Lenzen, KP., Heils, A., Muhle, H., Gresch, M., Neubauer, B.A., Waltz, S., Rudolf, G., Mattheisen, M., Strauch, K., Nürnberg, P., Schmitz, B., Stephani, U., Sander, T., (2005) Genetic dissection of photosensitivity and its relation to idiopathic generalized epilepsy. *Annals of Neurology*, 57(6), S.866–873.
- Tchernitchko, D., Goossens, M., Wajcman, H., (2004) In Silico Prediction of the Deleterious Effect of a Mutation: Proceed with Caution in Clinical Genetics. *Clinical Chemistry*, 50(11), S.1974–1978.
- Tiffin, N., Adie, E., Turner, F., Brunner, H.G., van Driel, M.A., Oti, M., Lopez-Bigas, N., Ouzounis, C., Perez-Iratxeta, C., Andrade-Navarro, M.A., Adeyemo, A., Patti, M.E., Semple, C.A., Hide, W., (2006) Computational disease gene identification: a concert of methods prioritizes type 2 diabetes and obesity candidate genes. *Nucleic Acids Research*, 34(10), S.3067–3081.
- Tiffin, N., Okpechi, I., Perez-Iratxeta, C., Andrade-Navarro, M.A., Ramesar, R., (2008) Prioritization of candidate disease genes for metabolic syndrome by computational analysis of its defining phenotypes. *Physiological Genomics*, 35(1), S.55–64.

- Tranchevent, L.C., Barriot, R., Yu, S., Van Vooren, S., Van Loo, P., Coessens, B., De Moor, B., Aerts, S., Moreau, Y., (2008) ENDEAVOUR update: a web resource for gene prioritization in multiple species. *Nucleic Acids Research*, 36(Web Server issue), S.W377–384.
- Vadlamudi, L., Andermann, E., Lombroso, C.T., Schachter, S.C., Milne, R.L., Hopper, J.L., Andermann, F., Berkovic, S.F., (2004) Epilepsy in twins: insights from unique historical data of William Lennox. *Neurology*, 62(7), S.1127–1133.
- Vadlamudi, L., Kjeldsen, M.J., Corey, L.A., Solaas, M.H., Friis, M.L., Pellock, J.M., Nakken, K.O., Milne, R.L., Scheffer, I.E., Harvey, A.S., Hopper, J.L., Berkovic, S.F., (2006) Analyzing the etiology of benign rolandic epilepsy: a multicenter twin collaboration. *Epilepsia*, 47(3), S.550–555.
- Waltz, S., Christen, H.J., Doose, H., (1992) The different patterns of the photoparoxysmal response--a genetic study. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 83(2), S.138–145.
- Weckx, S., Del-Favero, J., Rademakers, R., Claes, L., Cruts, M., De Jonghe, P., Van Broeckhoven, C., De Rijk, P., (2005) novoSNP, a novel computational tool for sequence variation discovery. *Genome Research*, 15(3), S.436–442.
- Wenzel, A., Fritschy, J.M., Mohler, H., Benke, D., (1997) NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins. *Journal of Neurochemistry*, 68(2), S.469–478.
- Wyllie, D.J., Livesey, M.R., Hardingham, G.E., (2013) Influence of GluN2 subunit identity on NMDA receptor function. *Neuropharmacology*. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390813000336>
- Yuan, H.Y., Chiou, J.J., Tseng, W.H., Liu, C.H., Liu, C.K., Lin, Y.J., Wang, H.H., Yao, A., Chen, Y.T., Hsu, C.N., (2006) FASTSNP: an always up-to-date and extendable service for SNP function analysis and prioritization. *Nucleic Acids Research*, 34, S.635–641.
- Zhang, E.Y., Fu, D.J., Pak, Y.A., Stewart, T., Mukhopadhyay, N., Wrighton, S.A., Hillgren, K.M., (2004) Genetic Polymorphisms in Human Proton-Dependent Dipeptide Transporter PEPT1: Implications for the Functional Role of Pro586. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 310(2), S.437–445.
- Zimprich, F., (2006) Genetik der Epilepsien. *Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie*. 7 (4), S. 35-42.
- van der Zwaag, B., Franke, L., Poot, M., Hochstenbach, R., Spierenburg, H.A., Vorstman, J.A., van Daalen, E., de Jonge, M.V., Verbeek, N.E., Brilstra, E.H., van't Slot, R., Ophoff, R.A., van Es, M.A., Blauw, H.M., Veldink, J.H., Buizer-Voskamp, J.E., Beemer, F.A., van den Berg, L.H., Wijmenga, C., van Amstel,

H.K., van Engeland, H., Burbach, J.P., Staal, W.G., (2009) Gene-network analysis identifies susceptibility genes related to glycobiology in autism. *PloS One*, 4(5), S.e5324.

8. Abbildungs – und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Identifikation von *GRIN2A* als geeignetes Kandidatengen für idiopathische Epilepsien – Seite 17

Abbildung 2: Schema zur Priorisierung – Seite 21

Abbildung 3: EEG-Beispiele zur Photosensitivität (PPR) – Seite 22

Abbildung 4: EEG-Beispiel zu zentrotemporalen Spikes and Waves (CTS) – Seite 23

Abbildung 5: Deletionen bei Patienten mit idiopathischen fokalen Epilepsien der Rolandischen Region – Seite 31

Abbildung 6: Polymorphismus chr 16:g 10032095 C>T – Seite 38

Abbildung 7: Protein-Modell zur Lokalisation der Mutation p.Ala243Val – Seite 48

Abbildung 8: Messungen des Öffnungsverhaltens – Seite 49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Priorisierung der Kandidatengene durch computergestützte Datenanalyse – Seite 29

Tabelle 2: Mikrodeletionen auf Chromosom16p13 – Seite 31

Tabelle 3: Patientenkohorte I (PPR) – Seite 32

Tabelle 4: Patientenkohorte II (CTS) – Seite 32

Tabelle 5: Polymorphismen der Kohorte I – Seite 33

Tabelle 6: Polymorphismen der Kohorte II – Seite 34

Tabelle 7a: In *Silico* Analysen der Exonregion für Kohorte I (PPR) – Seite 35

Tabelle 7b: In *Silico* Analysen der Intronregionen für Kohorte I (PPR) – Seite 35

Tabelle 7c: In *Silico* Analysen der Transkriptionsfaktorenbindungszone für
Kohorte I (PPR) – Seite 35

Tabelle 8a: In *Silico* Analysen der Exonregion für Kohorte II (CTS) – Seite 36

Tabelle 8b: In *Silico* Analysen der Intronregion für Kohorte II (CTS) – Seite 36

Tabelle 8c: In *Silico* Analysen der Transkriptionsfaktorenbindungszone für
Kohorte II (CTS) – Seite 36

Tabelle 9: Epilepsien im Kindesalter – Seite 62

Tabelle 10: Trainingsgene im Rahmen der computergestützten Priorisierung –
Seite 66

Tabelle 11: Primer des NCBI Primer Sets RSS000057426.1 – Seite 66

Tabelle 12: additive Primer – Seite 67

9. Anhang

9.1 Epilepsiesyndrome im Kindesalter

<i>Alter bei Krankheitsbeginn</i>	<i>Syndrome</i>
Neugeborenenezeit	benigne familiäre neonatale Epilepsie(BFNE) frühe myoklonische Enzephalopathie (FME) Ohtahara Syndrom (OS)
Kleinkindalter	Epilepsie der frühen Kindheit mit migratorischen fokalen Anfällen West Syndrom (WS) Myoklonische Epilepsie der frühen Kindheit (MEI) benigne frühkindliche Epilepsie (BFE) benigne familiäre frühkindliche Epilepsie (BFFE) Dravet Syndrom (DS) Myoklonische Enzephalopathie bei nicht progredienten Störungen
Kindesalter	Fiebergebundene Anfälle plus (FA+; „Fieberkrämpfe“ plus; können in der frühen Kindheit bzw. Kleinkindalter beginnen) Panayiotopoulos - Syndrom Epilepsie mit myoklonisch-atonischen Anfällen benigne Epilepsie mit zentrotemporalen Spikes (BEZTS; Rolando- Epilepsie) Autosomal-dominante nächtliche Frontallappenepilepsie (ADNFLE) späte beginnende kindliche Okzipitallappenepilepsie (Gastaut Typ) Epilepsie mit myoklonischen Absencen Lennox-Gastaut-Syndrom (LGS) Atypische benigne Partial-Epilepsie (ABPE, Pseudo-Lennox- Syndrom,PLS) Epileptische Enzephalopathie mit kontinuierlichen „spike-and- wave“-Entladungen im Schlaf (CSWS) Landau-Kleffner-Syndrom (LKS) Kindliche Absencen- Epilepsie (KAE)
Adoleszenz bis Erwachsenenalter	Juvenile Absencen-Epilepsie (JAE) Juvenile myoklonische Epilepsie (JME) Epilepsie mit nur generalisierten tonisch-klonischen Anfällen (EGTCS) Progressive Myklonusepilepsien (PME) Autosomal-dominante fokale Epilepsie mit akustischen Merkmalen (ADFEAM) andere familiäre Temporallappenepilepsien
Ohne Altersbezug	Reflexepilepsien Familiäre fokale Epilepsie mit variablen Herden (Kindheit- Erwachsenenalter)
Unverwechselbare Konstellationen	Mesiale Temporallappenepilepsien mit Hippocampussklerose (MTLE mit HS) Rassmussen-Syndrom Gelastische Anfälle bei hypothalamischen Hamartomen Hemikonvulsion-Hemiplegie-Epilepsie (-Syndrom)
strukturell-metabolische Ursachen	Malformationen der kortikalen Entwicklung (Hemimegalenzephalie, Heterotopien) Neurokutane Syndrome (Tuberöse-Sklerose-Komplex, Sturge- Weber-Syndrom...) Tumoren Infektionen

	Trauma Angiome Perinatale Insulte Schlaganfälle u.a.
Zustände mit epileptischen Anfällen, die nicht als Epilepsien betrachtet werden	Benigne neonatale Anfälle (BNA) Fiebergebundene Anfälle (FA, „Fieberkrämpfe“)

Tabelle 9: Epilepsien im Kindesalter

Bei den Epilepsiesyndromen im Kindesalter besteht eine charakteristische Altersabhängigkeit bezüglich des Krankheitsbeginns. In der Tabelle sind die häufigen kindlichen Epilepsiesyndrome mit alterstypischem Krankheitsbeginn aufgelistet. (Tabelle modifiziert gemäß ILAE Kommission (Engel 2006; Berg et al. 2010))

9.2 Datenbanken der computergestützten Priorisierung

Prioritizer

Datenbanken mit Informationen zu molekularen Mechanismen, Gen-Gen- sowie Protein-Protein-Interaktionen, Genfunktion sowie Zugehörigkeit zu Stoffwechselwegen und Signalkaskaden, die in die Analyse mit *Prioritizer* einfließen:

- Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG (<http://kegg.jp>)
- Biomolecular Interaction Network Database, BIND (<http://binddb.Org>)
- Reactome (<http://www.reactome.org>)
- The Human Protein Reference Database, HPRD (<http://www.hprd.org/>)
- Biomolecular Interaction Network Database, BIND (<http://binddb.Org>)
- The Gene Ontology Database, GO (<http://www.geneontology.org/>)
- Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)
- Stanford Microarray database (<http://smd.stanford.edu/>)
- Human Yeast Two-Hybrid Interactions
(<http://interactome.dfci.harvard.edu/>)

Endeavour

Datenbanken mit Informationen zu molekularen Mechanismen, Gen-Gen- sowie Protein-Protein-Interaktionen, Genfunktion sowie Zugehörigkeit zu Stoffwechselwegen und Signalkaskaden, die in die Analyse mit *Endeavour* einfließen:

- Medical Literature Analysis and Retrieval System Online, MEDLINE (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>)
- Gene Ontology, GO (<http://www.geneontology.org/>)
- InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)
- Biomolecular Interaction Network Database, BIND (<http://binddb.Org>)
- Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG (<http://kegg.jp>)
- Expressed Sequence Tag database, EST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html>)
- Stanford Microarray Database, SMD (<http://smd.stanford.edu/>)
- Atlas gene expression (<http://www.ebi.ac.uk/gxa/>)
- Entrez Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/gquery>)
- Sequence similarity, BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- Transcription Factor database, TRANSFAC (<http://www.gene-regulation.com/pub/databases/.html>)
- TOUCAN (<http://homes.esat.kuleuven.be/~saerts/software/toucan.php>)

G2d

Die Verfügbarkeit der gesamten Genomsequenz erlaubt eine Untersuchung von Linkage Regionen auf Kandidaten für neue Krankheitsgene. Krankheitsgene unterscheiden sich durch charakteristische Merkmale von normalen Genen. *G2d* berücksichtigt Sequenzdaten aus biomedizinischen Datenbanken:

- Medical Literature Analysis and Retrieval System Online, MEDLINE (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>)
- Medical Subjects Heading, MeSH (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/>)

- Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>)
- Gene Ontology, GO (<http://www.geneontology.org/>)
- The Reference Sequence Database, Refseq
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>)

Prospectr und Suspects

Daten und Geninformationen stammen aus:

- Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>)
- National Center for Biotechnology Information, NCBI Database
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- HomoloGene Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene>)
- InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)
- Swiss-PROT Database (<http://www.ebi.ac.uk/uniprot/>)
- Novartis Gene Expression Atlas
(<http://www.hsls.pitt.edu/obrc/index.php?page=URL1175095313>)
- Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>)
- Human Gene Mutation Database, HGMD (<http://www.hgmd.org/>)

Charakteristika, die von ***Prospectr*** berücksichtigt werden:

Genlänge, Länge der codierenden Sequenz (CDS), cDNA-Länge, Proteinlänge, Größe von 3'UTR und 5'UTR, Abstand zu benachbarten Genen, GC-Gehalt, Gehalt und Anzahl von Transmembran-Domänen, Vorhandensein von Signalpeptiden, verwandte Gene und Grad der Gleichheit, Genkonservierung, Informationen zu Gewebeexpression und Verteilung von Proteindomänen.

Trainingsgene für *Endeavour*

<i>Ensembl</i>	<i>Symbol</i>
ENSG00000140521	POLG
ENSG00000131089	ARHGEF9
ENSG00000082212	ME2
ENSG00000184156	KCNQ3
ENSG00000182389	CACNB4
ENSG00000114859	CLCN2
ENSG00000022355	GABRA1
ENSG00000187566	NHLRC1
ENSG00000182220	ATP6AP2
ENSG00000156113	KCNMA1
ENSG00000113327	GABRG2
ENSG00000182372	CLN8
ENSG00000101204	CHRNA4
ENSG00000105711	SCN1B
ENSG00000164904	ALDH7A1
ENSG00000075043	KCNQ2
ENSG00000160716	CHRNA2
ENSG00000177542	SLC25A22
ENSG0000008056	SYN1
ENSG00000112038	OPRM1
ENSG00000144285	SCN1A
ENSG00000102359	SRPX2
ENSG00000160213	CSTB
ENSG00000120903	CHRNA2
ENSG00000004848	ARX
ENSG00000096093	EFHC1
ENSG00000108231	LGI1
ENSG00000174469	CNTNAP2
ENSG00000112425	EPM2A

Tabelle 10: Trainingsgene im Rahmen der computergestützten Priorisierung

Für die Programme Endeavour und Prospectr&Suspects werden Trainingsgene für die Analyse benötigt. Hierzu wurden Epilepsiegene, die in der OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) Datenbank zum Zeitpunkt der Analyse gelistet waren, benutzt. Die Trainingsgensuche erfolgte mit dem Stichwort „Epilepsy“. Stand der Abfrage Juni, 2010.

9.3 Primer

<i>Probenname</i>	<i>FORWARD_PRIMER</i>	<i>REVERSE_PRIMER</i>
RSA001422348	tgtaaaacgacggccagtGAGGGAGGTGGATCTTTCCCA	caggaaacagctatgaccACCGCAGCAGAAAGACGCC
RSA001422655	tgtaaaacgacggccagtCTCCTGCACTTCGCCGCTG	caggaaacagctatgaccGGGCTCCCATTCTCCTGTGC
RSA000647835	tgtaaaacgacggccagtGGCTGTGACCCAGCATCACC	caggaaacagctatgaccTCCGTGATCCCAGCAGCCTA
RSA001422346	tgtaaaacgacggccagtTGGTTCTACCCAGGGCCAGT	caggaaacagctatgaccCACCTTGCAGGGACCGTCAG
RSA001422955	tgtaaaacgacggccagtGCCTCCAGGCTGTAGTCCC	caggaaacagctatgaccTGCTCAGGAATGTCTGCAAATGA
RSA001422345	tgtaaaacgacggccagtGTGTGCATCGGGACCTCTGG	caggaaacagctatgaccGTGGGCTGGGACATGCAGAA
RSA001422336	tgtaaaacgacggccagtCAGACAGATCGATCAATCCAGG	caggaaacagctatgaccCCTTGGCCTACCGGGTATG
RSA000647825	tgtaaaacgacggccagtGCTCAACAGGAAATGCGTGGG	caggaaacagctatgaccGCAAGCAGCTTCCTCAGGG
RSA001422333	tgtaaaacgacggccagtAAGGGTTGGGCACGTTACAG	caggaaacagctatgaccGGCTGGGATGGAGAAGTGC

RSA001422954	tgtaaacgacggccagtTGTCTGTGGAGTCAGTTGGACCAC	caggaaacagctatgaccCGTGTGGCCAGGTACAAG
RSA001422330	tgtaaacgacggccagtGGATTCTGGACAGGCACGGA	caggaaacagctatgaccTCCCCTGAATTGCATGGTT
RSA001422329	tgtaaacgacggccagtAGGAAACACGACCACTCGGG	caggaaacagctatgaccTCTGGCAACCTTCGGTGCTG
RSA000651856	tgtaaacgacggccagtGGGCCCATCTGGACCACAGT	caggaaacagctatgaccTGCATGCATTTACCTCCTAACACCA
RSA000412231	tgtaaacgacggccagtGGGAGCAAACATCATGCAAAGA	caggaaacagctatgaccGGGATGGAGAGGCCATGAGTC
RSA000651854	tgtaaacgacggccagtTTCTCATGTCCCGCCTGCTG	caggaaacagctatgaccTCCTCACTGCCTGTGAATGTTGTG
RSA001422323	tgtaaacgacggccagtTTTCAGGTAGGTGCGCTCGAC	caggaaacagctatgaccCCCTCATCATGGACATGGTTTCA
RSA001422321	tgtaaacgacggccagtAGGCAGGCATCGCACTTGAA	caggaaacagctatgaccGGACCCACTCCCTAAAGAGCCC
RSA001422369	tgtaaacgacggccagtCGTTGGTCATCCCTGTGGGAG	caggaaacagctatgaccGGGCTTTCCAACAACGACCA
RSA000389524	tgtaaacgacggccagtTGGACATCCAACATTTACCCTCCA	caggaaacagctatgaccCCTCAAGGACAGGGAACGGC
RSA001422368	tgtaaacgacggccagtTCAGGTTTACATGCACACCATATTGC	caggaaacagctatgaccTCGGAGCATGTTATGCCTTATGC

Tabelle 11: Primer des NCBI Primer Sets RSS000057426.1

<i>Lokalisation</i>	<i>FORWARD_PRIMER</i>	<i>REVERSE_PRIMER</i>
Promotor	tgtaaacgacggccagtCACTGGGGGAGGAGGAAG	caggaaacagctatgaccGTTTGAGGGCGAGTGTGTGT
Exon7+8	tgtaaacgacggccagtTGAACAAACCTTCCAGTGCT	caggaaacagctatgaccGTCCCATCCTCTGAGCAAAC
Exon9	tgtaaacgacggccagtTGATTAGCTTCTTTGAAGGATCA	caggaaacagctatgaccCACCATGCCTGGTCTAGAGT
Exon13	tgtaaacgacggccagtTCACTGCAACAATATTAGGTAGGC	caggaaacagctatgaccCCCAAGCGCTTTTCTAAACC
Exon14	tgtaaacgacggccagtCCCTATGCTTTGCAACTTGTC	caggaaacagctatgaccGAATCCACGGATTCTTCTCA

Tabelle 12: additive Primer

Die additiven Primer wurden mit Hilfe des frei verfügbaren, internetbasierten Programms Primer 3 (www.primer3.sourceforge.net) entworfen.

9.4 Glossar

Array comparative genomic hybridization, Array- CGH

Die Technik des *Array-CGH* dient der Identifikation von strukturellen genetischen Veränderungen (*Copy Number Variations*). Die Testprobe und eine Referenzprobe werden durch Fluoreszenzfarbstoffe markiert. Die Intensitäten des Farbsignals der Test-DNA und Referenzprobe werden gemessen und verglichen, um abweichende Kopien für den untersuchten Genabschnitt ermitteln zu können. Deletionen und Duplikationen können ab einer Größe von 5 bis 10 kb nachgewiesen werden. Durch hoch auflösende Arrays können Variationen ab einer Größe von 200 bp nachgewiesen werden.

Copy number variation

Copy Number Variations (CNVs) stellen quantitative, strukturelle Veränderungen im Genom von definitionsgemäß ≥ 1 kb dar. Neben Sequenzvariationen (= Basensubstitution, SNPs) haben strukturelle Variationen durch quantitative Veränderungen im Genom (Insertion, Deletion) Effekte auf Genregulation und Genexpression. Beispielweise kann eine Deletion im Bereich eines Transkriptionsfaktors zu einer reduzierten Genexpression führen. Für zahlreiche beschriebene CNVs wird eine Haploinsuffizienz als pathophysiologischer Mechanismus diskutiert.

Next Generation Sequencing

Prinzipiell ähnelt *Next generation Sequencing* (NGS) der klassischen Sangersequenzierung (siehe unten). NGS ermöglicht eine Beschleunigung der Sequenzierung durch parallelen Ablauf von Millionen von Reaktionsschritten. Die genomische DNA wird zunächst in eine Reihe von kleinen Segmenten fragmentiert. Diese werden in parallel verlaufenden Reaktionsschritten sequenziert. Anschließend werden die identifizierten Basenstreifen (Reads) anhand eines Referenzgenoms zusammengesetzt. Durch diese Technik können Forschungsgruppen ein gesamtes Genom in einem Zeitraum von Stunden bis Tagen untersuchen. (Im Vergleich: die Sequenzierung des ersten menschlichen Genoms benötigte knapp 10 Jahre, weitere 3 Jahre wurden benötigt um die Analysen abzuschließen.

Quelle: www.illumina.com/NGS

Non-Synonymous Single Nucleotide Polymorphisms

Eine genetische Mutation innerhalb einer codierenden Region, die den Austausch einer einzelnen Aminosäure in einer Proteinsequenz zur Folge hat, wird als *non-synonymous single nucleotide polymorphism* (nsSNP) bezeichnet. Diese Mutation kann wie SNPs in regulatorischen Bereichen eines Gens

potentiell die Proteinfunktion beeinflussen und damit den Phänotypen des Trägers.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Grundlegendes Prinzip der Polymerasekettenreaktion ist die Anlagerung zweier gegenläufiger Oligonukleotidprimer (*Annealing*) und die Verlängerung der DNA-Matrize (*Extension*) im Rahmen eines dreiteiligen Amplifikationszyklus. Zunächst kommt es in der Denaturierungsphase bei hohen Temperaturen zu einem Zerfall der doppelsträngigen DNA in DNA-Einzelstränge. In der darauf folgenden Annealing-Phase erfolgt durch primerspezifisches Absenken der Temperatur (spezifische Temperatur je nach Länge und G/C-Gehalt des verwendeten Oligonukleotidprimers) zu einer Hybridisierung der Primer an die komplementäre Zielregion der denaturierten und als Matrize fungierenden DNA. In der letzten Phase, der Extensionsphase, folgt die Verlängerung des Primers durch eine thermostabile DNA-Polymerase komplementär zum Matrizenstrang. In wiederholt aufeinander folgenden Amplifikationszyklen kommt es zur Akkumulation der DNA-Sequenz.

Rolando-Anfall

Typisch für eine Rolando-Epilepsie sind sensomotorische Anfälle sowie klonische und myoklonische Anfälle. Anfälle beginnen häufig mit Kribbeln oder Parästhesien im Gesichtsbereich gefolgt von hemifazialen Myoklonien oder klonischen Anfällen. Bei gleichzeitig bestehenden Schluckstörungen kommt es zur Hypersalivation und gurgelnden, grunzenden Lauten. Vor allem bei jüngeren Kindern kommt es häufig zu einer Anfallsausbreitung mit Muskelzuckungen im Bereich der oberen Extremität oder in Form eines sekundär generalisierten tonisch-klonischen Anfalles.

Sanger Sequenzierung

Bei der Sequenzierung nach Sanger handelt es sich um eine Kettenabbruchmethode. Der Einbau von Didesoxynukleotidtriphosphaten (ddNTPs) in die DNA führt zum Kettenabbruch.

Die ddNTPs werden mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. DNA-Proben werden in 4 Reagenzien (jeweils mit Nukleotiden und Polymerase) unterteilt – zu jedem Reagenz wird ein Didesoxynuklotid (ddATP, ddGTP, ddCTP oder ddTTP) zugegeben. Die neu synthetisierten DNA-Fragmente werden denaturiert und mittels Gelelektrophorese nach Größe aufgetragen. Jedes Reagenz (A, G, C, T) wird auf einer eigenen Bahn aufgetragen und die Sequenz kann direkt vom Film abgelesen werden. Die Kettenabbruchmethode hat die DNA-Sequenzierung maßgeblich vereinfacht und beschleunigt. Limitierend für eine erfolgreiche Sequenzierung sind unspezifische Primer, die durch falsches Annealing die DNA-Sequenz verfälschen können.

TaqMan[®] SNP assay

TaqMan[®] Reagenzien wurden von Applied Biosystems (ABI) für die Identifikation von SNPs entwickelt. Das Prinzip der Taqman Probe basiert auf der Aktivität des Enzyms Taq-Polymerase, einer 5'-3' Exonuklease und Fluoreszenzbasierter Markierung.

Taqman assays beinhalten zwei spezifische Primer zur Detektion der Zielregion um den zu identifizierenden SNP. Die Gensonden sind jeweils mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert (VIC oder 6-FAM).

Während der PCR hybridisieren die Primer spezifisch an das Ziel-DNA-Fragment, was zur Freisetzung des korrespondierenden Fluoreszenzstoffes führt.

10. Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Stephani für die Vergabe des Themas, die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten, die gute Betreuung und die zahlreichen wertvollen Ratschläge bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. med. Sarah von Spiczak, die mich bei der Durchführung der Studie begleitete, bei der Datenerhebung und anschließenden Auswertung hilfreich zur Seite stand und eine große Unterstützung bei allen, diese Dissertation betreffenden Angelegenheiten war.

Zum Schluss möchte ich mich auch bei meinen Eltern und meiner Familie, die mir auf meinem Weg immer hilfreich und unterstützend zur Seite stehen, ganz herzlich bedanken.

11. Lebenslauf

Personalien

Name und Vorname: Finsterwalder, Katrin-Maria
Geburtsdatum: 24.01.1985
Geburtsort: Garmisch-Partenkirchen
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulischer Werdegang

1991-1996 Volks- und Teilhauptschule, Farchant
1996-2005 St. Irmengard-Gymnasium, Garmisch-Partenkirchen
2005 Abitur

Universitärer Werdegang

WS 2005/2006 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
21.08.2007 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
WS 2008/2009 Beginn der Doktorarbeit in der Klinik für
Neuropädiatrie
24.11. 2011 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Beruflicher Werdegang

Seit 01.05.2012 Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik II, Klinik
für Kardiologie, Klinikum Kempten/Oberallgäu

12. Publikationsverzeichnis

Wissenschaftliche Artikel:

Reutlinger, C., Helbig I., Gawelczyk B., Subero J. I. M., Tönnies, H., Muhle, H., Finsterwalder, K., Vermeer, S., Pfundt, R., Sperner, J., Stefanova, I., Gillessen-Kaesbach G., von Spiczak, S., van Baalen, A., Boor, R., Siebert, R., Stephani U., Caliebe, A., 2010. Deletions in 16p13 including GRIN2A in patients with intellectual disability, various dysmorphic features, and seizure disorders of the Rolandic region. *Epilepsia*. 5(9). S. 1870-1873.

von Spiczak, S., Finsterwalder, K., Muhle, H., Franke, A., Schilhabel, M., Stephani, U., Helbig, I., 2011. Comprehensive analysis of candidate genes for photosensitivity using a complementary set of bioinformatic tools and experimental methods. *Epilepsia*, 52(10) 143-147.

Lemke, J. R., Lal, D., Reinthaler, E. M., Steiner, I., Nothnagel, M., Alber, M., Geider, K., Laube, B., Schwake, M., Finsterwalder, K., Franke, A., Schilhabel, M., Jähn, J. A., Muhle, H., Boor, R., van Paesschen W., Caraballo, R., Fejerman, N., Weckhuysen, S., de Jonghe, P., Larsen, J., Møller, R. S., Hjalgrim, H., Addis, L., Tang, S., Hughes, E., Pall, D. K., Veri, K., Vaher, U., Talvik, T., Dimova, P., López, R. G., Serratosa, J. M., Linnankivi, T., Lehesjoki, A. E., Ruf, S., Wolff, M., Buerki, S., Wohlrab, G., Kroell, J., Datta, A. N., Fiedler, B., Kurleman, G., Kluger, G., Hahn, A., Haberlandt, D. E., Kutzer, C., Sperner, J., Becker, F., Weber, Y. G., Feucht, M., Steinböck, H., Neophythou, B., Ronen, G. M., Gruber-Sedlmayr, U., Geldner, J., Harvey, R. J., Hoffmann, P., Herms, S., Altmüller, J., Tolia, M. R., Thiele, H., Nürnberg, P., Wilhelm, C., Stephani, U., Helbig, I., Lerche, H., Zimprich, F., Neubauer, B. A., Biskup, S., von Spiczak, S., 2013. Mutations in GRIN2A cause idiopathic focal epilepsy with rolandic spikes. *Nature Genetics*, 45(9), S.1067–1072.

Poster:

Finsterwalder, K., von Spiczak, S., Helbig, I., Muhle, H., Koeleman, B. P. C., Ostertag, P., Obermeier, T., Lindhout, D., Stephani, U., Computational Prediction of Candidate Genes for Photosensitivity, Epicure Project, 2010.

von Spiczak, S., Finsterwalder, K., Helbig, I., Reutlinger, C., Muhle, H., Caliebe, A., Obermeier, T., Schilhabel, M., Franke, A., Schwake, M., Stephani, U., Mutation screening of GRIN2A as a candidate gene for idiopathic focal epilepsies. Annual meeting of American Epilepsy Society, 2011.

Finsterwalder, K., von Spiczak, S., Helbig, I., Muhle, H., Reutlinger, C., Stephani, U., 2011 Generation of Candidate Genes for Idiopathic generalized and idiopathic focal Epilepsies. Forschungskolloquium der Klinik Für Neuropädiatrie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, 2011.

Wissenschaftliche Vorträge:

Finsterwalder, K., Helbig, I., de Kovel, C., Muhle, H., Obermeier, T., Koeleman, B., Lindhout, D., von Spiczak, S., Stephani, U., Computational prediction of epilepsy candidate genes, Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Epilepsie, Rostock, 2009.